

Aminoacyleinlagerung an Derivaten aliphatischer β - Hydroxysäuren

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

1958

von

Albert Hartmann

aus Grenzach (Deutschland)

1964

Aminoacyleinlagerung an Derivaten aliphatischer β - Hydroxysäuren

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Albert Hartmann

aus Grenzach (Deutschland)



PAUL JLLG, Photo-Offsetdruck, Stuttgart-S

1964

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Prof. Dr. M. Brenner und Prof. Dr. H. Dahn

Basel, den 21. Januar 1958

Prof. Dr. Kuno Meyer
Dekan

MEINEN LIEBEN ELTERN GEWIDMET

Für die unentwegte Hilfe und das stete Interesse, das Herr Prof. Dr. M. Brenner meiner Arbeit entgegengebracht hat, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

THEORETISCHER TEIL

I)	Einleitung	1
II)	Ergebnisse von J.P. Zimmermann, J. Wehrmüller und P. Quitt an Derivaten von O-(α -Aminoacyl)-salicylsäuren. Vorversuche von J. Wehrmüller an O-aminoacylierten aliphatischen β -Hydroxysäuren	2
III)	Eigene Arbeiten	9
A)	Aminoacyleinlagerungen an Derivaten aliphatischer β -Hydroxysäuren	9
a)	Allgemeines	9
1)	Problemstellung	9
2)	Theoretische Betrachtungen	9
b)	Die Praxis der Aminoacyleinlagerung	12
1)	Aminoacyl-Einlagerung in β -Hydroxybuttersäureamid	12
2)	Aminoacyl-Einlagerung in N-Acyl-serinamid-Derivate	13
3)	Reaktionsbedingungen für die Aminoacyl-Einlagerung	13
4)	Resultate	14
5)	Bemerkungen zur Frage der O $\rightarrow$ N-Acylwanderung	15
6)	Zum Problem der Herstellung von serin-freien Peptiden	18
c)	Theoretische Konsequenzen	19
B)	Synthese der Ausgangsmaterialien und der Vergleichspräparate	22
	Ausgangsmaterialien:	22
a)	O-Acyl- bzw. O-(α -Aminoacyl)-serin-Derivate	22
1)	Herstellung durch N $\rightarrow$ O-Acylwanderung	23
2)	Herstellung unter Verwendung von N-Carboxyanhydriden	24

	Seite
3) Einführung des Aminoacylrestes über geeignete Vorstufen (Azidokörper und N, N-Dibenzylglycyl-derivate)	25
4) Herstellung unter Verwendung von Anhydriden	25
"Phosgenmethode"	26
Symmetrische Anhydride	28
5) Herstellung durch Aufspaltung von Oxazolin- und Oxazolonringen	28
b) N-Benzoylierung von Serin	28
c) Decarbobenzoxylieung von O-(Cbzo- α -aminoacyl)-serinderivaten	29
d) Diskussion einiger weiterer Möglichkeiten	29
Vergleichspräparate:	31
e) Allgemeine Methoden zur Darstellung von Serin-peptiden	31
1) Temporärer Schutz der Hydroxy-Gruppe	32
2) Knüpfung der Peptidbindung	32
Azide	32
Säurechloride	34
Gemischte Anhydride	34
Aktivierte Ester	34
Carbodiimide	35
N-Carboxyanhydride	36
O $\rightarrow$ N-Acylwanderung	36
f) Herstellung der Vergleichspräparate unter Verwendung der Azid-Methode	36

VERZEICHNIS DER TABELLEN:

Tab. I	Bildung von Salicoyl-aminosäuren aus O-(Cbzo- α -aminoacyl)-salicylsäuren	3
Tab. II	Aminoacyl-Einlagerung bei O-(α -Aminoacyl)-salicylsäure-amid in wässrigem und wasserfreiem Milieu	5
Tab. III	Resultate von Aminoacyl-Einlagerungsversuchen an Derivaten aliphatischer β -Hydroxysäureamiden (Übersicht)	16

	Seite
Tab. IV O-, N- und O,N-Diacyl-Derivate von Serin	22
Tab. V Synthese von Serinpeptiden nach der Azid-Methode	33
Tab. VI R_f -Werte von β -Hydroxybuttersäureamid- und Serinamid-Derivaten	43
Tab. VII O-(Cbzo- α -aminoacyl)-N-acyl-serinamid-Derivate	47
Tab. VIII N-Benzoyl-L-serin durch Razematspaltung	50
Tab. IX O-(α -Aminoacyl)-Derivate von β -Hydroxybuttersäureamid und N-Acylserinamid	53
Tab. X Beständigkeit von O-Glycyl- β -hydroxybuttersäureamid bzw. O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid in wässrigem und wasserfreiem Milieu	55
Tab. XI Resultate von Aminoacyl-Einlagerungs-Versuchen an Derivaten aliphatischer β -Hydroxysäureamiden	57
Tab. XII Vergleichspräparate	58
Tab. XIII Zwischenprodukte bei der Herstellung der Vergleichspräparate	61

EXPERIMENTELLER TEIL

I) Übersicht über einige präparative und analytische Methoden	40
A) Allgemeines über Veresterung, Ammonolyse und Hydrazinolyse	40
1. Veresterung mit Diazomethan	40
2. Ammonolyse von Methylestern	40
3. Hydrazinolyse von Methylestern	41
B) Analytische Methoden	41
1. Papierchromatographische Kontrolle	41
2. Total- und Partialhydrolyse	44
II) Synthese der Ausgangsmaterialien	44
A) O-Acylierung nach der Methode der "Gemischten Anhydride" mit Isovaleriansäure O-(Cbzo-glycyl)-DL- β -hydroxybuttersäureamid	44

B)	O-Acylierung von Serinderivaten nach der "Phosgen-Methode"	45
	Allgemeine Arbeitsvorschrift	45
1.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-DL-serinamid	47
2.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-L-serinamid	47
3.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-glycyl-DL- serinamid	47
4.	O-(Cbzo-L-phenylalanyl)-N-benzoyl-L- seryl-glycinamid	47
C)	Ausgangsstoffe für die Herstellung der unter II/B genannten Verbindungen	48
1)	N-Benzoyl-DL-serinamid	48
2)	N-Benzoyl-L-serinamid	48
a)	N-Benzoyl-L-serin	48
	Nach Schotten-Baumann	48
	Durch Razematspaltung	49
b)	N-Benzoyl-L-serinmethylester	50
c)	N-Benzoyl-L-serinamid	50
3)	N-Benzoyl-glycyl-DL-serinamid	51
a)	N-Benzoyl-glycyl-DL-serin	51
b)	N-Benzoyl-glycyl-DL-serinamid	51
4)	N-Benzoyl-L-seryl-glycinamid	51
D)	O-(α -Aminoacyl)- β -hydroxycarbonsäure- amide durch Hydrogenolyse der unter II/B genannten Verbindungen	52
	Allgemeine Arbeitsvorschrift	52
1.	O-Glycyl-DL- β -hydroxybuttersäureamid- hydrochlorid	53
2.	O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinamid-hydro- chlorid	53
3.	O-Glycyl-N-benzoyl-L-serinamid-hydro- chlorid	53

	Seite
4. O-Glycyl-N-benzoyl-glycyl-DL-serin- amid-hydrochlorid	53
5. O-(L-Phenylalanyl)-N-benzoyl-L-seryl- glycinamid-hydrochlorid	53
III. Umlagerung von O-(α -Aminoacyl)- β -hydroxysäure- amiden zu den entsprechenden β -Hydroxyacyl- α - aminosäureamiden	54
1. Vorbereitung der Ionenaustauscher	54
2. Lösungsmittel und Base	54
3. Umlagerungsversuche	55
a) In 2n wässrigem Ammoniak, 2n Triäthylamin in Methanol, tert. Butanol und Chloroform	55
b) In abs. tert. Butanol bzw. Dimethylformamid mit 1n Kalium-tert.butylat	55
c) In flüssigem Ammoniak in Gegenwart von Na- triumamid	56
Umlagerungsprodukte	57
1. DL- β -Hydroxybutyryl-glycinamid	57
2. N-Benzoyl-DL-seryl-glycinamid	57
3. N-Benzoyl-L-seryl-glycinamid	57
4. N-Benzoyl-glycyl-DL-seryl-glycinamid	57
5. N-Benzoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycin- amid	57
IV. Synthese der Vergleichspräparate.	58
A) Vergleichspräparate	58
1. DL- β -Hydroxybutyryl-glycinamid	58
2. N-Benzoyl-DL-seryl-glycinamid	58
3. N-Benzoyl-L-seryl-glycinamid	58
4. N-Benzoyl-L-seryl-L-phenylalanyl- glycinamid	58
B) Zwischenprodukte bei der Herstellung der Ver- gleichspräparate	59

	Seite
1) DL- β -Hydroxybutyryl-glycinmethylester	59
a) DL- β -Hydroxybuttersäurehydrazid	59
b) DL- β -Hydroxybutyryl-glycinmethylester	59
2) N-Benzoyl-DL-seryl-glycinmethylester	59
a) N-Benzoyl-DL-serinhydrazid	59
b) N-Benzoyl-DL-seryl-glycinmethylester	59
3) N-Benzoyl-L-seryl-glycinmethylester	60
a) N-Benzoyl-L-serinhydrazid	60
b) N-Benzoyl-L-seryl-glycinmethylester	60
4) N-Benzoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycinmethylester	60
V. Verschiedenes	62
1. O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serin	62
2. N-Cbzo-DL-serinamid	62
3. O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serinamid	62
4. O, N-Di-(Cbzo-glycyl)-DL-serin	63
Zusammenfassung	63
Literatur	64

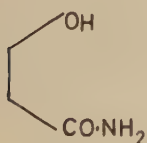
THEORETISCHER TEIL

1) EINLEITUNG

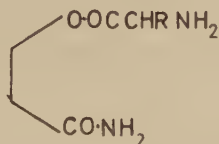
Im Jahre 1952 beschrieb J.P. Zimmermann¹⁾ in seiner Dissertation eine bisher unbekannte Umlagerung von O-Aminoacylsalicylsäuren bzw. O-Aminoacyl-salicylsäureamiden. Seine Resultate und die nachfolgenden Arbeiten von J. Wehrmüller²⁾ und P. Quitt³⁾ führten zur Erkenntnis eines neuen Prinzips zum Aufbau von Peptidketten⁴⁾ und beanspruchen deshalb ein großes Interesse. Die genannten Untersuchungen sind aber alle an Salicylsäurederivaten durchgeführt worden und lieferten deshalb nur Salicyl-Peptide. Demgegenüber befaßt sich nun die vorliegende Arbeit mit der entsprechenden Reaktion an Derivaten von aliphatischen β -Hydroxysäuren, insbesondere an solchen des Serins.

Zur Bezeichnung der Zimmermann'schen Umlagerungsreaktion und ihrer Varianten ist der Begriff Aminoacyleinlagerung ("AAE")⁵⁾ eingeführt und - unter Berücksichtigung der Resultate in der aliphatischen Reihe - folgendermaßen definiert worden:

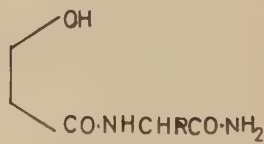
Verestert man die Hydroxylgruppe eines β -Hydroxysäure-amids I mit einer α -Aminosäure und unterwirft man den resultierenden Aminosäureester II, gegebenenfalls unter Ausschluß von Wasser, der Einwirkung geeigneter basischer Agenzien, so erfolgt eine Umlagerung. Aus II entsteht ein N-(β -Hydroxyacyl)-aminoacyl-amid III.



I



II



III

Allgemein chemischer Erfahrung zufolge muß der primäre Amid-Stickstoff von III mit dem primären Amid-Stickstoff von I bzw. II identisch sein. Der in die Hydroxylgruppe von I eingeführte Aminoacylrest befindet sich also nach der Umlagerung zwischen dem Carbonyl und dem Amid-Stickstoff von I: Formal hat sich der Aminoacyl-

rest vom β -ständigen Sauerstoff in II gelöst, um 180° gedreht und in die Carbonamidgruppe "eingelagert".

Die Bezeichnung "Aminoacyl-Einlagerung" basiert danach auf dem Ergebnis der Umlagerung. Der Name ist zwar eine unvollkommene, aber kurze und praktisch ausreichende Umschreibung für das Wesen dieser Reaktionsart. Er umfaßt auch ihre bisher aufgefundenen Varianten:

AAE	
bei aminoacylierten β -Hydroxysäuren	1) 2) 4)
bei aminoacylierten β -Mercaptosäuren	1a) 4)
bei aminoacylierten α -Hydroxysäuren	6)
unter Hydroxyphenyl-imidazol-Bildung	1) +)

II. ERGEBNISSE VON J.P. ZIMMERMANN, J. WEHRMÜLLER UND P. QUITT AN DERIVATEN VON O-(α -AMINOACYL)-SALICYLSÄUREN. VORVER- SUCHE VON J. WEHRMÜLLER AN O-AMINOACYLIERTEN ALIPHATISCHEN β -HYDROXYSÄUREN

Die O-(α -Aminoacyl)-salicylsäuren (IV)⁷⁾ sind unbeständig. Sie lagern sich im Augenblick ihrer Bildung in Salicoyl-aminosäuren um. So erhält man aus O-(Cbzo- α -aminoacyl)-salicylsäure-benzyl-estern (V) bei Behandlung mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium in Methylcellösolve oder Eisessig Salicoyl-aminosäuren (VI). Die Debenzylierung kann auch mittels Phosphonium-jodid in Eisessig erfolgen, wobei wahrscheinlich zuerst ein Hydrojodid von (IV) entsteht, das bei der Aufarbeitung - unter Abgabe von HJ - in (VI) übergeht (vergl. IVc und VIc). Bemerkenswert ist, daß die Konfiguration am asymmetrischen C-Atom des Amino-acylrestes erhalten bleibt (vergl. Tab. I).

+) Siehe Fußnote Nr. 5, Seite 1498 in (5).

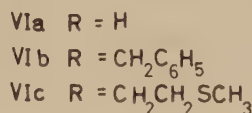
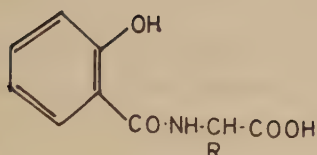
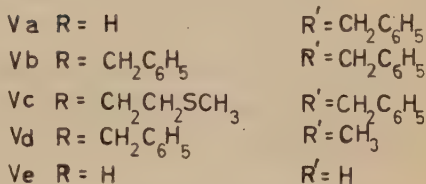
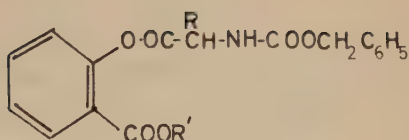
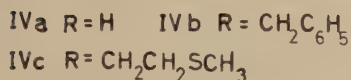
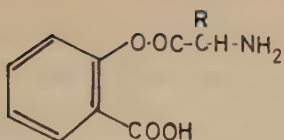


Tabelle I

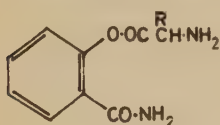
Bildung von Salicyl-aminosäuren aus O-(Cbzo- α -aminoacyl)-salicylsäuren

Ausgangs- material	Debenzylierungs- bedingungen	Reaktions- produkt	Ausbeute % rein	Smp. u. Misch.- Smp. mit auth. Material
Va	H ₂ /Pd-Kohle in Eisessig oder Methylcellosolve, 20°	VIa	87	171 - 172°
Vb		VIb (DL)	95	152 - 153°
Ve		VIa	90	171 - 172°
Vb (L)	H ₂ /Pd-Kohle, Eisessig, 50°	VIb (L)	86	118 - 119°
Vc	PH ₄ J in Eisessig, 7 Std. bei 50 - 55°	VIc	84	114 - 115°

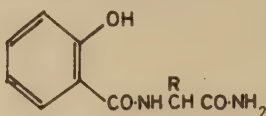
Die Verbindungen IV lassen sich aber in Form von Salzen mit starken Säuren abfangen. Aus O-(Cbzo-glycyl)-salicylsäure (Va) entsteht z. B. das Perchlorat von O-Glycyl-salicylsäure (IVa), wenn die Debenzylierung mittels H₂/Pd in Eisessig-Perchlorsäure durchgeführt wird⁸⁾. IVa läßt sich aus Eisessig unverändert umkristallisieren. Im Gegensatz dazu erfolgt in Lösungsmitteln, welche vermöge ihrer Basizität eine solvolytische Zersetzung des Salzes bewirken, mehr oder weniger rasche Bildung von Sali-

coyl-glycin (VIa)⁺. In Wasser kann die Umlagerung anhand der Eisenchlorid-Reaktion des phenolischen Hydroxyls von VIa (λ max. 520 m μ) colorimetrisch verfolgt werden. Sie erfolgt nach dem Zeitgesetz der 1. Ordnung und verläuft umso langsamer, je saurer die Lösung ist⁺⁺). Nebenreaktionen scheinen nur in basischen Medien aufzutreten. Es ist vor allem die Hydrolyse der Phenylesterbindung, die hier in den Vordergrund tritt. Dies hängt damit zusammen, daß die Aminoacyl-Einlagerung in dieser Variante - anders als bei den O-(α -Aminoacyl)- β -hydroxysäure-amiden II - nicht nur durch Säure, sondern auch durch Salzbildung mit Basen gebremst wird.

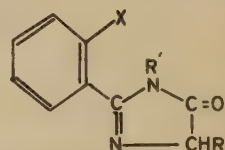
Analog und im Sinne des allgemeinen Schemas II $\rightarrow$ III⁵⁾ erhält man aus dem Perchlorat von O-Phenylalanyl-salicylsäure-amid (VII), erhalten durch Decarboxylierung von O-(Cbzo-phenylalanyl)-salicylsäure-amid mittels Palladium/Wasserstoff in Eisessig/Perchlorsäure, beim Auflösen in 10-prozentigem, wässerigem Hydrogencarbonat, 2n wässriger Soda, Ammoniak-Lösung oder Natronlauge Salicyl-phenyl-alanin-amid (VIIIa). Die Umlagerungen sind nach wenigen Minuten beendet, die Ausbeuten sind durchweg gut (Tab.II). Ebenso verhält sich die Glycinverbindung VIIb, wobei aber die Ausbeute an Umlagerungsprodukt VIIIb in Hydrogencarbonat deutlich schlechter ist. Ferner wird bei dem Natronlauge-Versuch an Stelle VIIIb dessen Verseifungsprodukt Salicoyl-glycin erhalten.



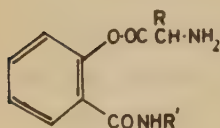
VIa R = CH₂C₆H₅
VIb R = H



VIIa R = CH₂C₆H₅
VIIb R = H



IXa R = CH₂C₆H₅; R' = H ; X = OH
IXb R = H ; R' = CH₃ ; X = H



Xa R = CH₂C₆H₅
Xb R = H
Xc R = CH₂C₆H₅

R' = CH₂COOCH₃
R' = CHCONHCH₂COOCH₃
|
CH₂C₆H₅
R' = CHCONHCH₂COOCH₃
|
CH₂C₆H₅

⁺) Vergl. Tabelle I, Seite 1934 in (7).

⁺⁺) Vergl. Figur 1, Seite 2377 in (8).

Die erwähnte Ausbeuteverschlechterung wird durch eine Nebenreaktion verursacht. Es handelt sich dabei um jene Variante der AAE, die zu Imidazolonen IX führt. Die Imidazolombildung wird zur Hauptreaktion, wenn die Umlagerung unterhalb pH 8 erfolgt. So erhält man aus dem Perchlorat von VIIa in Phosphatpuffer (pH 6,9 und 5,9) oder Acetatpuffer (pH 5,0) ausschließlich 2-(2'-Hydroxy-phenyl)-4-benzyl-imidazol-(5) IXa¹⁾. Die AAE kann auch im wasserfreien Milieu erfolgen (Tab. II). Hierbei ist bemerkenswert, daß Basen wie Ammoniak, Diäthylamin und Triäthylamin die Imidazolombildung nur in Gegenwart hydroxylhaltiger Lösungsmittel vollständig unterdrücken. In flüssigem Ammoniak erhält man aus VIIa sogar quantitativ das Imidazolon IXa. Eine Ausnahme macht 2n Triäthylamin in Chloroform. Dieses Medium eignet sich ausgezeichnet zur präparativen Gewinnung von offenkettigen Säureamiden VIII.

Tabelle II
AAE bei VIIa in wässrigem und wasserfreiem Milieu

Lösungsmittel	% Ausbeute an	
	Salicyl-phenylalaninamid	2-(2'-Hydroxyphenyl)-4-benzyl-imidazol-(5)
10-proz. KHCO ₃	93	--
Na ₂ CO ₃ 2n	94	--
NH ₃ 2n	92	--
NaOH 2n	92	--
Phosphatpuffer pH 6,90	--	94
Phosphatpuffer pH 5,95	--	92
Acetatpuffer pH 5,05	--	93
Diäthylamin 2n in Wasser	91	--
Triäthylamin 2n in Wasser	89	--
Diäthylamin 2n in Methanol	84	--
Triäthylamin 2n in Methanol	90	--
Triäthylamin 2n in Chloroform	91 ⁺	-- ⁺
Diäthylamin 2n in Tetrahydro-furan	60 ⁺	30 ⁺
Triäthylamin 2n in Tetrahydro-furan	70 ⁺	25 ⁺
NH ₃ flüssig, wasserfrei	--	97

⁺) Unreine Produkte

Die Tendenz zur Imidazonbildung geht zurück, wenn man von VIIa zum O-Phenylalanyl-salicyl-glycin-methylester (Xa) übergeht. Sie verschwindet fast ganz bei den O-Aminoacyl-salicyl-dipeptid-derivaten Xb, c^{1a) 3)}.

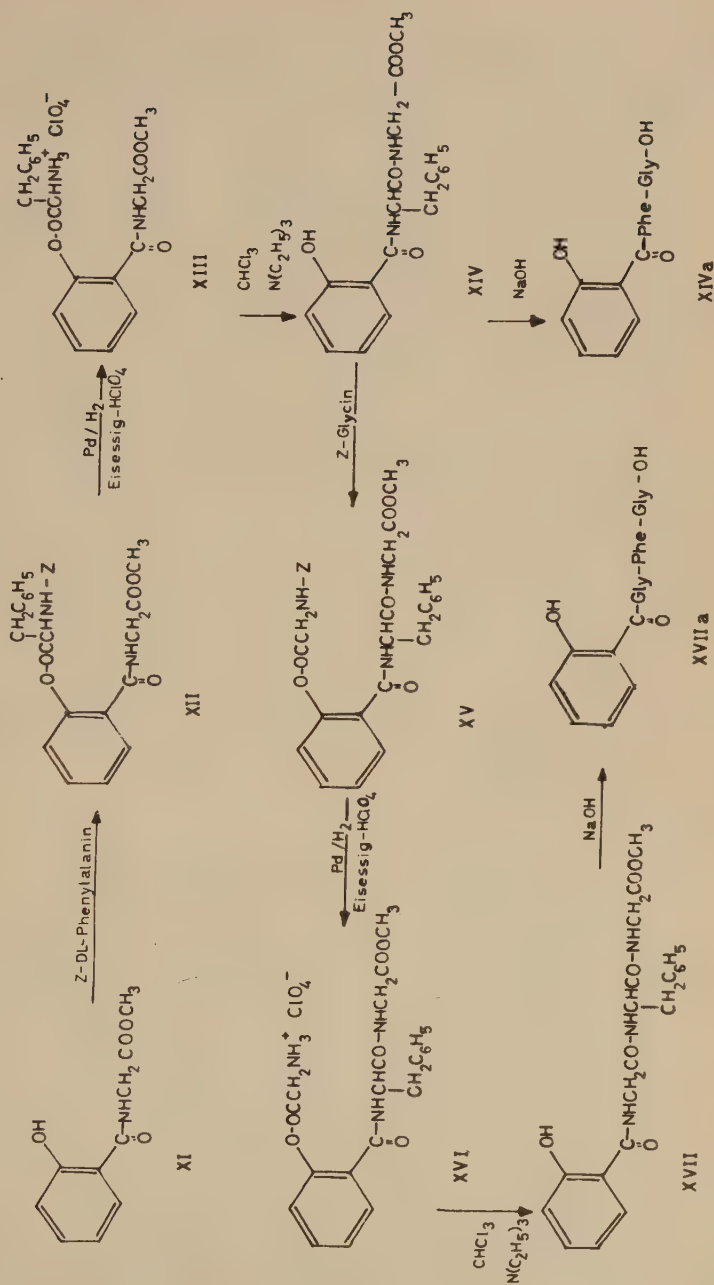
Im Gegensatz dazu bleibt die Fähigkeit zur AAE erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt indessen bei den schwereren Molekeln ab. So können Verbindungen vom Typus Xa, b, c wegen konkurrierender Hydrolyse der Phenylesterbindung nicht mehr gut in wässrigen Medien umgelagert werden. Hier hat sich jedoch Triäthylamin in Chloroform bewährt.

Als Beispiel verweise ich auf die Beschreibung der Synthese von Salicyl-glycyl-phenylalanyl-glycin (Schema 1, Reaktionsfolge XI bis XVII) durch M. Brenner und Mitarb.⁵⁾ Das verwendete Ausgangsmaterial XI ist von J.P. Zimmermann^{1) 7)} und J. Wehrmüller^{2) 8)} aus O-Glycyl-salicylsäure durch eine der eingangs genannten Varianten der Aminoacyleinlagerungs-Reaktion erhalten worden.

Der im Schema 1 skizzierte Aufbau des Salicyl-tripeptid-methylesters XVII stellt nun ein Beispiel für das bereits oben erwähnte neue Prinzip zum Aufbau von Peptidketten dar. Solche Verbindungen hat man bisher ausschließlich nach dem Verfahren der "Aminoacyl-Anlagerung" hergestellt. Ein Beispiel hierzu bietet die zweite Synthese von XVII, die nach dem auf Seite 8 angegebenen "normalen" Schema 2 durchgeführt⁵⁾ wurde, um das Einlagerungsprodukt mit authentischem Material zu vergleichen.

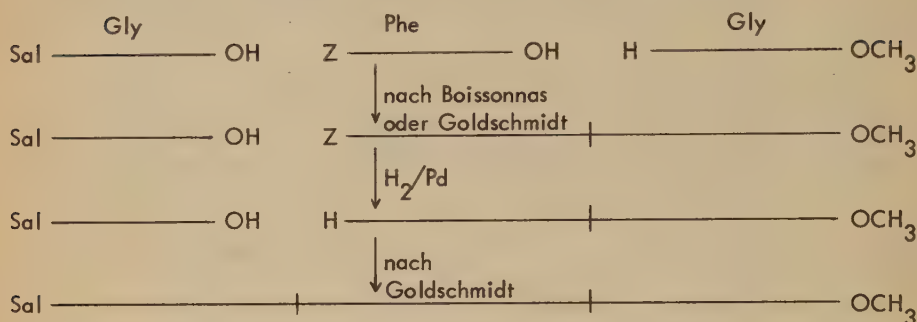
Besonders reizvoll erschien jetzt natürlich der Versuch, die AAE an einem aliphatischen System durchzuführen. Zum Beispiel muß, falls die Reaktion erfolgt, das O-Glycyl- β -hydroxybuttersäure-amid (XVIII) in β -Hydroxybutyryl-glycinamid (XIX) verwandelt werden. Entsprechende Experimente von J. Wehrmüller²⁾ unter den in der Salicylsäure-Reihe erprobten Bedingungen verliefen jedoch ergebnislos. Auch O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid (XX) gab in wässrig-alkal. Lösung kein N-Benzoyl-seryl-glycinamid (XXI)²⁾.

Schema 1: Synthese von XVII nach dem Verfahren der Aminoacyl - Einlagerung (Z = Carbobenzoxy -)

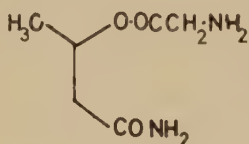


Schema 2

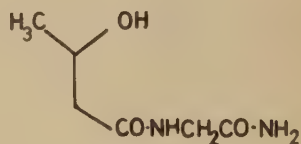
Synthese von XVII nach dem Verfahren der Aminoacyl - Anlagerung



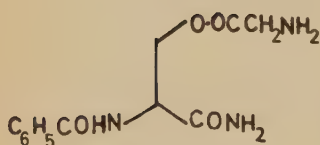
Sal bedeutet Salicoyl, ein waagrechtcr Strich entspricht dem darüber angegebenen Aminosäure-rest Glycyl oder Phenylalanyl, der Unterteilungsstrich ———|——— stellt eine Peptidbindung dar⁺⁾ .



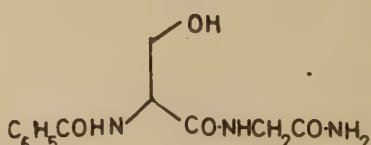
XVIII



XIX



XX



XXI

⁺⁾ Vergl. dazu die Darstellungsweisen von R.A. Boissonnas et.al. und W. Rittel et.al. (9).

III) EIGENE ARBEITEN

A) AMINOACYL-EINLAGERUNG AN DERIVATEN ALIPHATISCHER β -HYDROXYSÄUREN

a) Allgemeines

1) Problemstellung

Es stellte sich die Frage nach der Ursache für den Mißerfolg von J. Wehrmüller. Er konnte energetisch oder kinetisch bedingt sein. Die erste Möglichkeit fiel bei näherem Zusehen kaum in Betracht: Im Verlauf einer AAE (II $\rightarrow$ III) wird in der Stoffbilanz eine Esterbindung geöffnet und eine Amidbindung geschlossen; da die Umsetzung in basischem Medium erfolgt, sind keine Ionisierungsarbeiten zu leisten. Solche Prozesse verlaufen bei reversibler Führung mit einer Abnahme der freien Energie.

F_{2980}° beträgt etwa -6000 cal, wenn die Reaktion intermolekular und die beteiligte Estergruppe aliphatisch ist¹⁴⁰⁾. Wir wandten uns daher dem Studium des Reaktionsmechanismus zu. Es war zu hoffen, daß ein Verständnis der Einlagerung in der Salicylsäure-Reihe Anhaltspunkte dafür geben würde, unter welchen Bedingungen die Reaktion in der aliphatischen Reihe gegebenenfalls zu führen sei. Anhand so gewonnener Erkenntnisse sollte dann das Problem der AAE bei Serinderivaten angepackt werden.

2. Theoretische Betrachtungen

Die am phenolischen Hydroxyl aminoacylierten Salicyl-amide gehören zu der bekannten Gruppe der O-Acyl-salicylamide. Titherley¹⁰⁾ hat im Zusammenhang über O $\rightarrow$ N-Acylwanderung bei Acetyl- und Benzoyl-salicylsäure-amiden die Vermutung ausgesprochen, daß außer dem O- und dem N-Isomeren XXIIa, b noch eine tautomere zyklische Form der Acyl-salicylsäure-amide XXIIc existiere. Studien von W. Schneider und J.P. Zimmermann in unserem Laboratorium, über die noch nichts veröffentlicht wurde, charakterisieren nun die O-Acyl-salicylsäure-amide XXIIa als Pseudo-säuren¹¹⁾. Ihre Lösungen in wässrigem Ammoniak, verdünnter Natronlauge, 2n Pyridin/Wasser oder 1n Triäthylamin/Methylenchlorid enthalten Anionen, welche sich

nach spektroskopischen Befunden vom Titherley'schen Tautomeren XXIIc ableiten und die Konstitution XXIIId besitzen müssen. Rekombination von XXIIId mit einem Proton führt je nach dem Charakter des Acylrestes zum N-Isomeren XXIIb (Acylwanderung) oder zurück zum O-Isomeren XXIIa; bei längerer Einwirkung wässriger Basen kann auch Hydrolyse der Phenylester-Bindung eintreten.

Enthält aber der Acylrest in α -Stellung eine Aminogruppe, wie es z.B. bei VII der Fall ist, so tritt ein neues Moment auf. Man erkennt dies bei räumlicher Betrachtung des entsprechenden Anions XXIII. Fig. 1 stellt eine vereinfachte perspektivische Seitenansicht von XXIII dar. Außer dem Amino-Stickstoff in Fig. 1 sind alle eingezeichneten Atome in ihrer gegenseitigen räumlichen Lage fixiert. Bei freier Drehbarkeit der C-C-Bindung in der Gruppe $\Rightarrow C - \overset{H}{\underset{R}{C}} - NH_2$ bewegt sich der Amino-Stickstoff auf einer Kreisbahn. Er gelangt so immer wieder in die unmittelbare Nachbarschaft zum Carbonylkohlenstoff der Amidgruppierung.

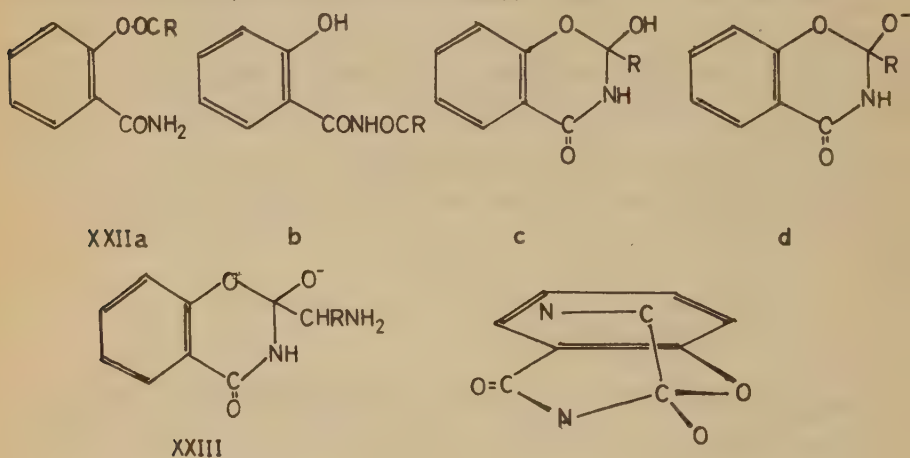
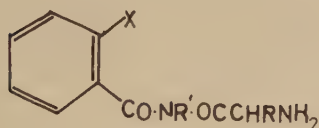


Fig. 1

Es sei jetzt in Erinnerung gerufen, daß die AAE zu offenkettigen Amiden nicht in jedem beliebigen basischen Milieu erfolgt (Tab. 2). Offenkettige Amide ohne Beimengung von Imidazolen entstehen interessanterweise nur in Medien, welche bei O-Acetyl-salicylsäure-amid rasche und weitgehende Anionenbildung nach XXIIId gewährleisten^{1a) 12)}. Daraus erfolgt fast zwingend, daß Anionen, welche nach Fig. 1

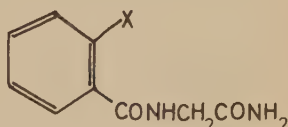
gebaut sind, beim Übergang von VII in VIII als Zwischenprodukte auftreten. Bis zu diesem Punkt stützt sich die Diskussion auf experimentelle Daten. Über den weiteren Verlauf der Reaktion ist vorerst allein bekannt, daß das Endprodukt VIII entsteht. Grundsätzlich könnte sich aus XXIII ein Diacyl-imid XXIVa bilden¹³⁾ ($O \rightarrow N$ -Acylwanderung nach Titherley). Während indessen die Modellsubstanzen XXIVb tatsächlich nach XXV umlagern, trifft dies bei dem N-Alkyl-Derivat XXIVc nicht mehr zu: Letzteres bildet in basischem Milieu im wesentlichen das Imidazolone IXb^{1a)}. Da, wie bereits ausgeführt worden ist, die N-Alkyl-Verbindungen vom Typus X kaum mehr Imidazolone, sondern vorzugsweise offenkettige Amide geben, halten wir die intermediäre Bildung von Diacylimiden bei der AAE für wenig wahrscheinlich.



XXIVa $X = OH$; $R' = H$

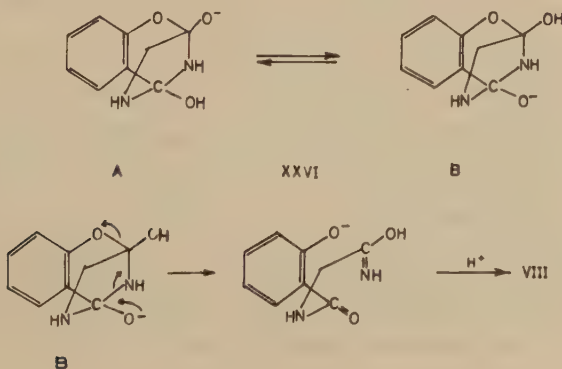
XXIVb $X = H$ oder OCH_3 ; $R = R' = H$

XXIVc $X = H$; $R = CH_3$; $R = H$

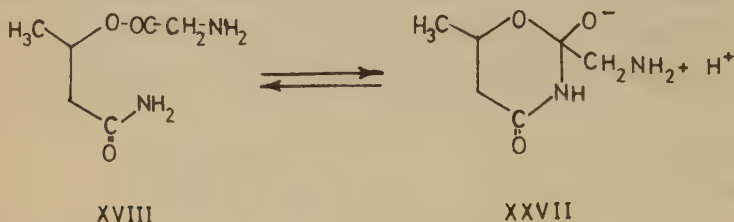


XXV $X = H$ oder OCH_3

Andererseits erscheint es als durchaus möglich, daß der Amino-Stickstoff von XXIII aus seiner idealen Stellung heraus (Fig. 1) mit der Carbonylgruppe unter Bildung eines neuen Anions XXVI A, B koordiniert. Ladungsverschiebung in B im Sinne einer Stabilisierung würde dann direkt das offenkettige Säureamid VIII ergeben.



Nach dieser skizzierten Auffassung ist also der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche AAE die Bildung eines cyclischen Anions (z.B. XXIII). Sie ist bei den Salicylsäure-Derivaten sterisch außergewöhnlich begünstigt^{1a) 12)}. Diese Begünstigung fehlt in der aliphatischen Reihe. Ein Anion XXVII aus O-Glycyl- β -hydroxy-buttersäure-amid (XVIII) wird deshalb eine sehr geringe Stabilität besitzen. Der Reaktionsgleichung entsprechend war seine Bildung unter diesen Umständen nur bei extrem kleiner Konzentration von H^+ zu erwarten.



b) Die Praxis der Aminoacyl-Einlagerung

1) Aminoacyl-Einlagerung in β -Hydroxy-buttersäure-amid

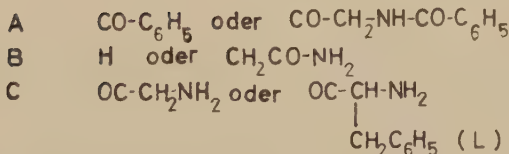
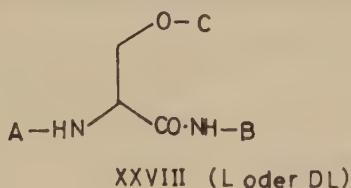
Zunächst ist experimentell wieder auf das O-Glycyl- β -hydroxy-buttersäure-amid XVIII²⁾ als Modellsubstanz zurückgegriffen worden. Durch AAE war daraus das schon vorn erwähnte β -Hydroxy-butyryl-glycin-amid XIX zu erwarten. Unter den oben entwickelten Gesichtspunkten ist das Hydrochlorid des Esters XVIII während 15 Minuten der Einwirkung von Kalium-tert.butylat in tert.Butanol unterworfen worden. Dabei bildet sich in der Tat durch AAE praktisch quantitativ das β -Hydroxybutyryl-glycin-amid (XIX). In ganz untergeordnetem Maße entsteht nebenher durch Zersetzung β -Hydroxysäure-amid und Glycin; wahrscheinlich bedingen Spuren von Feuchtigkeit eine geringe Spaltung des Esters. Zur Aufarbeitung wurde die alkoholisch-wässrige Lösung mit einem Gemisch von überschüssigem saurem und überschüssigem basischem Ionenaustauscher entsalzt, das Lösungsmittel verdampft und das Umlagerungsprodukt aus Alkohol/Äther kristallisiert. Es konnte durch Kristallform, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt, Papierchromatogramm,^{+) IR-Spektrum und Analyse mit einem nach der Curtius'schen Azid-Methode}

^{+) Vergl. exp. Teil Seite 44}

14) bereiteten Vergleichspräparat identifiziert werden.

2) Aminoacyl-Einlagerung in N-Acylserinamid-Derivate

Durch diesen Erfolg an einer Modells substanz ermutigt, wandte ich mich der AAE bei dem schon früher erwähnten O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid XVII zu. Sie gelang. Deshalb dehnte ich die Untersuchung auf weitere Derivate des N-Acyl-serinamides aus (vgl. XXVIII). Dabei strebte ich bewußt danach, durch geeignete Variation der Reste A, B und C des Grundkörpers XXVIII und den Übergang von der DL- in die L-Reihe zu möglichst peptidähnlichen Körpern zu gelangen:



Die Benzoylgruppe wurde der Einfachheit halber benutzt. Sie vertritt einen beliebigen Acylrest, z.B. einen Aminoacyl- oder Peptidyl-Rest mit oder ohne geeigneter abspaltbarer Schutzgruppe auf dem aminoendständigen Stickstoff.

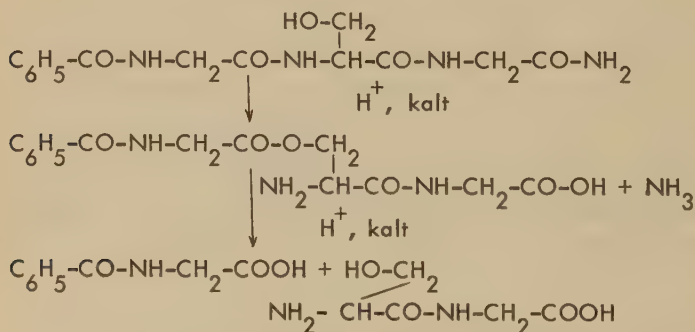
3) Reaktionsbedingungen für die Aminoacyl-Einlagerung

Wie bereits ausgeführt worden ist, läßt sich die Aminoacyl-Einlagerung in der aliphatischen Reihe nur in Gegenwart von starken Basen erfolgreich durchführen. Als am geeignetsten erwies sich vorläufig das Arbeiten bei Zimmertemperatur mit überschüssigem Kaliumtert.butylat in abs. tert Butanol oder, bei Löslichkeitsschwierigkeiten, in Dimethylformamid. Bewährt hat sich auch Natrium-amid in flüssigem Ammoniak.

4) Resultate

In der folgenden Tabelle (3) findet sich eine Zusammenstellung der Experimente, welche ich durchgeführt habe (Ausgangsmaterialien, Reaktionsbedingungen, Produkte und Ausbeuten). Mit Ausnahme von XXXIV wurden alle durch AAE erhaltenen Produkte analysiert und wie das β -Hydroxybutyryl-glycinamid (XIX) (vgl. Seite 13) durch Vergleich mit den authentischen Präparaten identifiziert.

Im Falle von N-Benzoyl-glycyl-DL-seryl-glycinamid (XXXII) zeigte sich, daß das Aminoacyl-Einlagerungsverfahren dem klassischen Verfahren überlegen ist, indem das Vergleichspräparat trotz großen Anstrengungen nicht rein erhalten werden konnte. Die Struktur des durch Umlagerung erhaltenen Produktes XXXII konnte aber durch Verbrennungs-Analyse (C, H, O und N), Ammoniak-Bestimmung im Hydrolysat, sowie durch Sequenzanalyse mittels Partialhydrolyse ⁺⁾ sichergestellt werden: Serin-Peptide zeigen bekanntlich wegen N $\rightarrow$ O-Acylwanderung ⁺⁺⁾ in saurer Lösung eine gewisse Labilität. Die N-Peptidbindung wird am Serin zur O-Peptidbindung und diese erweist sich als besonders wenig stabil:

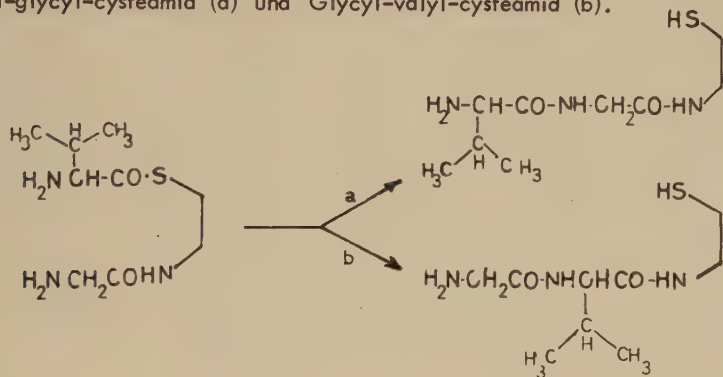


Im Papierchromatogramm des sauren Partialhydrolysats konnten in der Tat als Spaltprodukte, wie erwartet, N-Benzoyl-glycin und Seryl-glycin nachgewiesen werden.

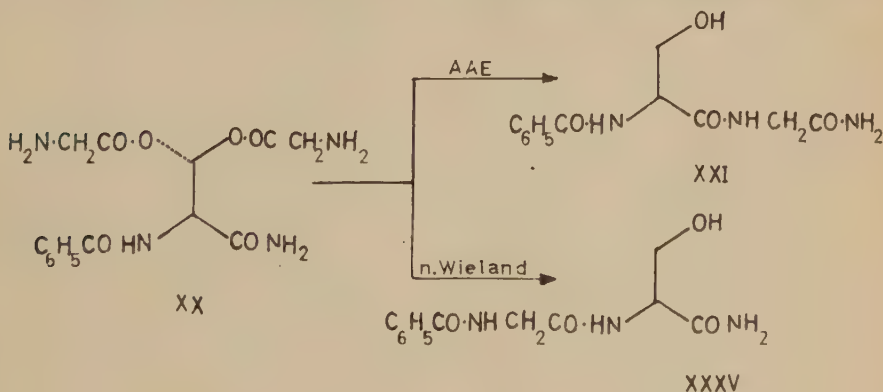
+) siehe exp. Teil Seite 44
 ++)) vgl. Seite 23 ff.

5) Bemerkungen zur Frage der O→N-Acylwanderung

Es soll noch kurz auf eine zweite Reaktionsmöglichkeit von O-Aminoacyl-N-benzoyl-serinamid-Derivaten hingewiesen werden, die über eine Bergmann'sche¹⁵⁾ O→N-, bzw. Wieland'sche¹³⁾ S→N-Acylwanderung sekundär zu Produkten führen würde, welche zu unserem Einlagerungsprodukt isomer wären. Wie das folgende Schema zeigt, sollen aus S-Valyl-N-glycyl-cysteamid zwei Umlagerungsprodukte entstehen: Valyl-glycyl-cysteamid (a) und Glycyl-valyl-cysteamid (b).



Überträgt man diese Reaktionsmöglichkeit schematisch auf O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid (XX), so könnte man außer N-Benzoyl-seryl-glycinamid (XXI) (AAE) auch das Isomere Benzoyl-glycyl-serinamid (XXXV) erwarten (Acylwanderung nach Wieland:



Ein Vergleich von authentischem Benzoyl-glycyl-serinamid (XXXV) mit authentischem

Tabelle III

Resultate von Aminoacyl-Einlagerungsversuchen an Derivaten aliphatischer β - Hydroxysäureamide

Ausgangsmaterial	Versuchsbedingungen	Vers.- Dauer	Hauptprodukt ⁺	Ausb. %	Nebenprodukte ⁺
O-Glycyl- β -hydroxy- buttersäure-amid (XVIII)	Wasser 2n NH ₃ in Wasser	72 St. 1 St.	AM		(Glycin) (H-Gly-NH ₂ ; DP)
	Methanol	72 St.	AM		HBA, Glycin, (DP)
	2n Et ₃ N in t. Butanol	72 St.	AM		-
	Chloroform	72 St.	AM		-
	3 Aeq. K-t. butylat in t. Butanol	30 Min.	β -Hydroxybutyryl- glycin-amid (XIX)	70	(HBA, Glycin)
O-Glycyl-N-benzoyl- DL-serin-amid (XX)	Wasser 2n NH ₃ in Wasser	72 St. 1 St.	AM		(Glycin)
	Methanol	72 St.	BzSA + Glycin		(H-Gly-NH ₂ , DP)
	2n Et ₃ N in t. Butanol	72 St.	AM		BzSA + Glycin
	Chloroform	72 St.	AM		-
	3 Aeq. K-t. butylat in t. Butanol 2,5 Aeq. Natrium in fl. Ammoniak	30 Min. 30 Min.	N-Benzoyl-DL-seryl- glycinamid (XXI)	80	(BzSA + Glycin)
O-Glycyl-N-benzoyl- L-serin-amid (XXIX)	3 Aeq. K-t. butylat in t. Butanol	30 Min.	N-Benzoyl-L-seryl- glycinamid (XXX ⁺⁺)	65	(BzSA + Glycin)
O-Glycyl-N-benzoyl- glycyl-DL-serinamid (XXXI)	3 Aeq. K-t. butylat in t. Butanol	30 Min.	N-Benzoyl-glycyl- DL-seryl-glycin- amid (XXXII)	60	(BzGSA + Glycin)
	3 Aeq. K-t. butylat in DMFA	30 Min.		60	(BzSA + Glycin)
O-(L-Phenylalanyl)- N-benzoyl-L-seryl- glycin-amid (XXXIII)	3 Aeq. K-t. butylat in DMFA	30 Min.	N-Benzoyl-L-seryl- L-phenylalanyl- glycinamid (XXXIV ⁺⁺⁺)		BzSGA + Phe-alanin
	2,5 Aeq. Natrium in fl. Ammoniak	30 Min.			BzSGA + Phe-alanin

Legende zu Tabelle III

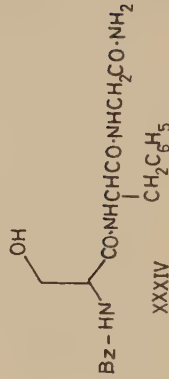
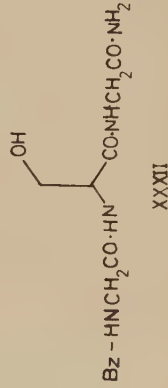
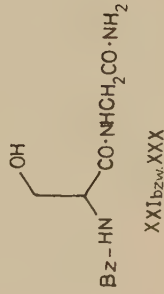
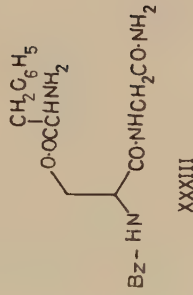
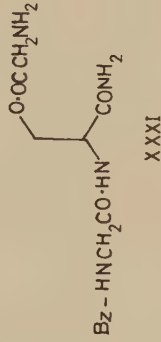
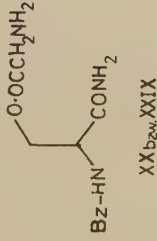
AM = Ausgangsmaterial
 BzSA = Benzoyl-serinamid
 BzSGA = Benzoyl-seryl-glycinamid
 DP = Glycindiketopiperazin

HBA = Hydroxybuttersäureamid
 BzGSA = Benzoyl-glycyl-serinamid
 DMFA = Dimethylformamid

+) Die Haupt- und Nebenprodukte wurde isoliert und papierchromat. erkannt. Die in Klammern stehenden Substanzen entstanden nur in geringen Mengen.

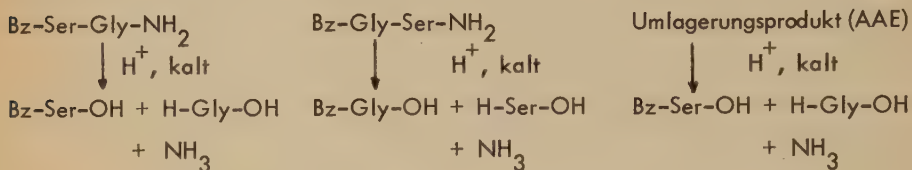
++) Drehung identisch mit der des entsprechenden Vergleichspräparates, siehe exp. Teil, Tab. XI und XII.

+++ Vorläufig erst papierchromatographisch identifiziert.



Bz = Benzoyl

Benzoyl-seryl-glycinamid (XXI) zeigte wohl gleiches papierchromatisches Verhalten, aber deutliche Unterschiede im Schmelzpunkt, IR-Spektrum und bei der Partial-Hydrolyse^{+) :}



Bz = Benzoyl-, Abkürzungen für Aminosäuren s.E. Brand und J. Edsall⁽¹⁶⁾.

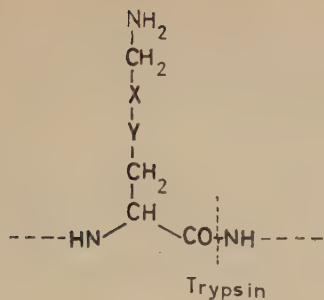
Auf Grund dieser Befunde ist es wenig wahrscheinlich, daß unter den Bedingungen der AAE das isomere Produkt N-Benzoyl-glycyl-serin-amid (XXXV) entstanden ist.

6) Zum Problem der Herstellung von "serinfreien" Peptiden

Es soll noch kurz auf eine Möglichkeit der Synthese von "serinfreien" Peptid-derivaten mit Hilfe der AAE hingewiesen werden. Es ist seit langem bekannt, daß N- α -Benzoyl-lysinamid und N- α -Benzoylglycyl-lysinamid⁷⁵⁾ in Gegenwart von Trypsin rasch in das entsprechende N- α -Acyl-lysin und Ammoniak gespalten werden. Dabei ist es unerläßlich, daß die basische Gruppe, die ϵ -Amino-Gruppe, frei vorliegt.

H. Lindley⁷⁶⁾ zeigte nun vor kurzem, daß eine kleine Änderung der Seitenkette in Lysin (XXXVI), nämlich der Ersatz einer CH₂-Gruppe durch Schwefel (gleiche Raumerfüllung und ähnlicher Bindungswinkel) praktisch ohne Einfluß ist auf die Spaltbarkeit durch Trypsin. Poly-Lysin (XXXVIa) und das Polymere von S-(β -Aminoäthyl)-cystein (XXXVIb) werden durch Einwirkung von Trypsin hydrolysiert und es ist durchaus möglich, daß sich das analoge O-(β -Aminoäthyl)-Derivat des Serins (XXXVIc) gleich verhält. Damit wäre eine Möglichkeit gegeben, in dem oben erwähnten Peptid "Ser-X-Y-Z" das aminoendständige Serin mitsamt seiner Amino-Schutzgruppe enzymatisch zu ent-

^{+) Vgl. Seite 44}



XXXVI a	X = -CH ₂	Y = -CH ₂
b	X = -CH ₂	Y = S
c	X = -CH ₂	Y = O
d	X = CO	Y = O oder S

fernen, vorausgesetzt, daß das Peptid kein Lysin⁺⁾ mit freier ε-Amino-Gruppe enthält. Wie oben erwähnt, scheint die Benzoyl-Gruppe hier besonders geeignet zu sein. Sehr interessant wäre diese Spaltungsmöglichkeit mit Trypsin im Falle von O-Glycyl-serin- bzw. S-Glycyl-cystein-Derivaten (XXXVI d), da Verbindungen dieser Art leichter zugänglich sind wie die entsprechenden β-Aminoäthyl-Derivate, speziell im Falle von Serin. Es ist aber fraglich, ob die Änderungen in der Seitenkette nicht zu groß sind, als daß diese Verbindungen auf Trypsin noch ansprechen. Dazu kommt die große Empfindlichkeit von O-Aminoacyl-Derivaten oberhalb pH 6,5.

c) Theoretische Konsequenzen

Wie meine Ausführungen zeigen, konnte die Aminoacyl-Einlagerungsreaktion nun auch in der aliphatischen Reihe, unter Ersatz der Salicylsäure durch Derivate von β-Hydroxybuttersäure oder von Serin, verwirklicht werden.

In der Folge wurde in unserem Laboratorium der Anwendungsbereich der AAE durch systematische Übertragung der an Serin-Derivaten gewonnenen Erfahrungen auf andere Hydroxysäure-Derivate beträchtlich erweitert. So konnte U. Beglinger (17) die AAE an einem Acyl-Threonin-Derivat durchführen. Entsprechende Untersuchungen von E. Kny und H. Curtius in der Cysteinreihe stehen kurz vor dem Abschluß. Schließlich ist durch Arbeiten von P. Quitt (6) in jüngster Zeit gezeigt worden, daß AAE selbst dann erfolgt, wenn beide Partner, Aminosäure und Hydroxysäure, der α-

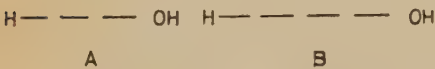
⁺⁾ und kein Arginin enthält. Siehe G.W. Schwert und Mitarb. (77).

Reihe oder der β -Reihe oder irgendeiner Kombination von α - und β -angehören.

Diese Ergebnisse eröffnen eine Fülle von praktischen und theoretischen Möglichkeiten^{4) 18)}.

Alle bekannten Verfahren zum Aufbau von Peptidketten gehen auf das Ideengut von Emil Fischer und Th. Curtius zurück. Die allgemeine Konzeption ist im Schema 1⁴⁾ dargestellt. Die beiden Komponenten A und B können beliebig groß sein. Jede kann insbesondere aus einer einzigen Aminosäure bestehen. Es wird also z.B. ein Oktapeptid durch Reaktion mit einer Aminosäure in ein Nonapeptid umgewandelt.

Schema 1



Schema 2



Der 9. Aminoacylrest wird dabei an eines der beiden Enden des Oktapeptides angelagert. Da man sich jedes Peptid durch Anlagerung eines Aminoacylrestes an das nächst kleinere Peptid entstanden denken kann, wird für das Fischer'sche Synthesprinzip die Bezeichnung Aminoacyl-Anlagerung ("AAA") vorgeschlagen. Jedermann ist zur Zeit der selbstverständlichen Ansicht, daß auch die biologische Synthese von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen auf Basis der AAA-Reaktion erfolge.

Demgegenüber repräsentiert die Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion (Schema 2) einen zweiten und mindestens ebenso interessanten Weg zum Aufbau von Peptiden und Proteinen. Sie erfordert kein Entzweibrechen der Peptidkette und läßt die Kettenen-

⁴⁾ Ein Strich (—) sei das Symbol eines Aminosäurerestes HNCHRCO (Aminoacylrest), H-OH das Symbol einer Aminosäure H-HNCHRCO-OH und die schematische Formel H-----OH das Symbol eines Peptides aus 5 Aminosäuren, wobei jeder Strich einen Aminoacylrest darstellt und jede Lücke zwischen 2 Strichen einer Peptidbindung entspricht.

den unverändert. Man wird dies bei künftigen Betrachtungen über den Mechanismus der Eiweissynthese mitberücksichtigen müssen. Wenn es möglich ist, aminoendständiges Serin bzw. N-Acyl-serin in einem Peptid-Derivat vom Typ "Ser-X-Y-Z", erhalten durch fortgesetzte AAE, selektiv abzuspalten, dann steht das Prinzip der AAE dem Prinzip der AAA gleichberechtigt zur Seite und bietet zudem noch eine Fülle von neuen Reaktionsmöglichkeiten.

Im folgenden seien einige denkbare Reaktionswege skizziert, die besonderes biochemisches Interesse beanspruchen.

So hafte z.B. eine Serin-Molekel mit ihrem Stickstoff (α -Aminogruppe) an einer Nucleinsäure oder sei Bestandteil einer Peptidkette. Ihre OH-Gruppe kann nun fortgesetzt als Akzeptor für herangeführte Aminosäuren dienen und diese quasi wie durch einen "Trichter" in die Peptidkette eintreten lassen. Das Resultat dieser Anordnung ist eine Peptidkette, die aus dem Serin-Rest "herauswächst", ohne daß sich die Enden der Kette verändern. In gleicher Weise kann auch die Erweiterung eines Peptidringes erfolgen. Postuliert man zusätzlich Umkehrbarkeit der AAE, so ist ein Polyeptid oder Eiweiß in der Lage, eigene Aminosäuren gegen Aminosäuren des umgebenden Mediums auszutauschen, ohne daß deshalb ein Öffnen der Kette notwendig wird. Ein solcher Mechanismus bietet vielleicht eine Erklärung für Austauschreaktionen, wie sie zwischen markierten Aminosäuren und Eiweiß beobachtet worden sind (19).

Man mag einwenden, die Bedingung eines extrem basischen Mediums, wie sie der Reagenzglasversuch erfordert, sei in einem Organismus nicht erfüllbar. Jene Bedingung fällt aber dahin, sobald die lebende Zelle das als Zwischenprodukt auftretende cyclische Anion (XXVlb) auf irgendeine andere Weise stabilisiert. Ein instruktives Beispiel für den Effekt einer Stabilisierung auf sterischem Wege bietet die AAE in der Salicylsäure-Reihe. Der aromatische Ring fixiert die primär reagierenden Zentren (Carbophenoxy und Carbonamid) in geeigneter gegenseitiger Lage und erleichtert dadurch die Anionenbildung in solchem Maße, daß die AAE schon zwischen pH 7 und 8 erfolgt.

Analog wirkende Enzyme würden auch in der aliphatischen Reihe die Durchführung der AAE unter physiologischen pH-Bedingungen ermöglichen. Es ist zur Zeit eines unserer Hauptanliegen, derartige Enzyme in der Natur aufzufinden.

B) SYNTHESE DER AUSGANGSMATERIALIEN UND DER VERGLEICHSPRÄPARATE -AUSGANGSMATERIALIEN-

a) O-Acyl- bzw. O-(α -Aminoacyl)-serinderivate

Tabelle IV

O-, N- und O,N-Diacyl-Derivate von Serin

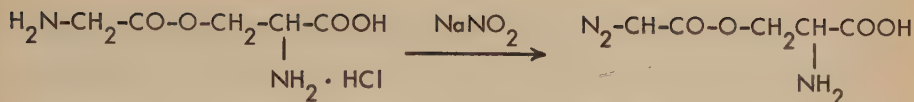
O-Acyl-	N-Acyl-	O,N-Diacyl-
Bz: 15) 20) 21) 22) 23) Ac: 24) 25) 26) Cbzo: 27) Phosphat: 28) 29) 30) 31) Sulfat: 32) Glycyl: 33) 34) 35)	Bz: 15) 21) 37) 38) Ac: 20) Cl-Ac: 39) 40) Cbzo: 27) 28) 29) 33) 36) 41) 42) 43) 44) Glycyl: 34)	Bz/Bz: 38) Bz/Ac: 20) 23) Ac/Cbzo: 27) Ac/Pht: 25) Cl-Ac/Cbzo: 34) Br/Cbzo: 34) Azido-Ac/Cbzo: 34) Cbzo/Cbzo: 27) 29) Cbzo-Gly/Cbzo: 34) Cbzo-Gly/Cbzo-Gly: 34) Gly/Cbzo: 33)

Abkürzungen:

Bz = Benzoyl, Ac = Acetyl, Cl-Ac = Chloracetyl, Br-Ac = Bromacetyl, Pht = Phthaloyl, Gly = Glycyl.

Über die O-Aminoacylierung von β -Hydroxy- α -aminosäure-, besonders von Serinderivaten finden sich in der Literatur nur dürftige Angaben. Erst im Jahre 1954 ist diese Stoffklasse im Zuge der Entdeckung des Antibiotikums "Azaserin"⁴⁵⁾ durch eine Reihe von Synthesen der Schlüsselsubstanz O-Glycyl-serin^{33) 34)} erschlossen worden. Durch die systematischen Untersuchungen von J.A. Moore, E.D. Nikolaides und Mitarb.^{33) 34)} im Rahmen der Azaserinsynthese konnten Methoden gefunden werden, die es zusammen mit Resultaten von L. Velluz und Mitarb.³⁵⁾ und unseren eigenen Ergebnissen⁴⁶⁾ gestatten, die Ausgangsmaterialien für die AAE in guter Ausbeute zu beschaffen.

Anhand der Synthese von O-Glycylserin, dessen selektive Diazotierung zum Antibiotikum Azaserin führt,



soll die Einführung des Glycylrestes in das Hydroxyl des Serins mit den verschiedensten Methoden kurz besprochen werden.

1) Herstellung durch O → N-Acylwanderung

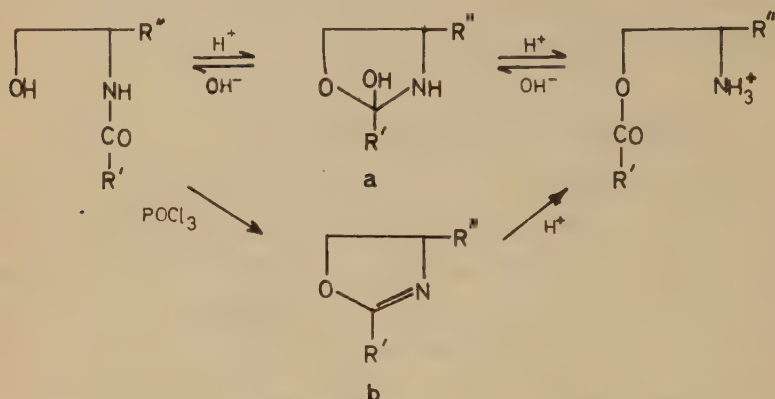
Die direkte Einführung des Glycylrestes ohne Schutz seiner Aminogruppe gelingt durch N → O-Acylwanderung. Wie schon Seite 14 erwähnt, zeigen Peptide mit Serin und Threonin eine erhöhte Labilität in saurer Lösung. So wird nach P. Desnuelle und A. Casal⁴⁷⁾ und besonders D.F.Elliott²³⁾ die Peptidbindung, an der die Hydroxyaminosäure mit ihrer Aminfunktion beteiligt ist, gelöst und der Acylrest wandert ev. über eine cyclische Zwischenstufe an das Hydroxyl⁺⁾. Nach J.I. Harris und Mitarb.⁴⁸⁾ wird N-Glycylserin bei der sauren Hydrolyse fünf mal schneller gespalten wie das inverse Seryl-Glycin. Die Wanderung des Acylrestes vom Stickstoff zum Sauerstoff ist mit einer Reihe von sauren und auch wasserabspaltenden Agenzien erreicht worden:

Kalte konzentrierte Schwefelsäure ^{23) 33) 49) 50)}	
alkoholische Salzsäure ^{49) 51) 52)} ,	wasserfreie Phosphorsäure ⁵³⁾ ,
Salzsäure in Nitromethan ⁵⁰⁾ ,	Acetanhydrid in Methanol ⁵⁴⁾ ,
wasserfr. Ameisensäure ²⁴⁾ ,	Ameisensäure/Bortrifluorid ⁵²⁾ ,
Phosphoroxchlorid ⁵²⁾ ,	Phosphorpentachlorid und Thionylchlorid ^{49) 55)} .

Konzentrierte Schwefelsäure und wasserfreie Ameisensäure scheinen von ganz spezifischem Einfluß zu sein. So wurde Edestin⁴⁹⁾ nach längerem Stehen in konzentrierter Schwefelsäure 70 mal rascher hydrolysiert mit 6n Salzsäure (18°) als ohne diese Behandlung. Und Lysozym²⁴⁾ verliert beim Stehen in Ameisensäure seine enzymat. Aktivität, um sie in Wasser bei pH 7,5 wieder vollständig zurück zu gewinnen. Als Zwischenprodukt bei Verwendung von sauren Stoffen wird von D.F.Elliott²³⁾ und

^{+) Vgl. Reaktionsschema Seite 14.}

J.L. Bailey⁵²⁾ die Bildung eines Hydroxy-oxazolidins (a) postuliert; im Falle der Säurechloride werden Oxazoline (b) durchlaufen, die durch Spuren von wässriger Säure zum O-Acylderivat geöffnet werden.



So konnte N-Glycyl-serin durch längeres Stehen in konzentrierter Schwefelsäure nach Elliott²³⁾ in mäßiger Ausbeute in O-Glycyl-serin³³⁾ umgelagert werden.

Mit Hilfe des Oxazolin-Ringschlusses gelangten M. Bergmann und A. Miekeley¹⁵⁾ und später auch D.F. Elliott²¹⁾ vom N-Benzoyl-serin bzw. vom N-Benzoyl-threonin zu den entsprechenden O-Benzoylderivaten (siehe obiges Schema). Solche O-Acyl-serin³³⁾ und -threoninderivate sind nur in saurer Lösung stabil; schon in neutral bis schwach alkalischem Milieu (pH 7,5) lagern sie rasch und quantitativ in die entsprechenden N-Acylderivate um.

Die Ester mit anorganischen Säuren (siehe Tab. IV, Seite 22), wie das O-Sulfat³²⁾ und O-Phosphat^{28) 29) 30) 31) +)} des Serins zeigen keine Tendenz zur O $\rightleftharpoons$ N-Acylwanderung in Alkali bzw. Säure (langsamer Zerfall durch Hydrolyse).

2) Herstellung unter Verwendung von N-Carboxy-anhydriden

Etwas günstiger, aber noch nicht ideal, ist die Methode der O-Acylierung mit N-Carboxy-anhydriden von Aminosäuren, die erstmals von E. Brand und B.F. Er-

+) N-Phosphoamino-säuren s. L. Zervas und Mitarb. (51).

langer⁵⁶⁾ zur Darstellung von Aminosäurebenzylestem benutzt worden ist⁺⁾. Durch Erwärmen einer Lösung von Cbzo-serin, Glycinanhydrid und 1 Äquivalent Salzsäure in Dioxan wurde O-Glycyl-N-Cbzo-serin-hydrochlorid³³⁾ in 67 % Ausbeute als Öl erhalten. Das Verfahren eignet sich nur für kleine Ansätze; Nebenreaktionen durch Polymerisation des N-Carboxyanhydrides⁺⁾ konnten nicht vermieden werden. Das entspricht übrigens ganz unseren eigenen Erfahrungen mit dieser Stoffklasse. Analog erhielt J.L.Bailey⁵²⁾ O-Glycyl-β-nitro-äthanol.

3) Einführung des Aminoacylrestes über geeignete Vorstufen (Azido-Körper und N, N-Dibenzylglycyl-Derivate)

Wesentlich vorteilhafter ist die Einführung des Glycins über eine Vorstufe oder in geschützter Form, etwa als Cbzo-Derivat, was eine nachträgliche Erzeugung bzw. Regenerierung des Glycylrestes gestattet. So wurden eine Reihe von O-(Halogenacetyl)-N-Cbzo-serinderivate³⁴⁾ durch direkte Acylierung mit den entsprechenden Säurehalogeniden bzw. Anhydriden (mit und ohne Base) hergestellt. Als Acylierungsmittel dienten Chloracetylchlorid, Bromacetylbromid und Chloressigsäure-anhydrid. Ersatz des Halogens durch die Azido-Gruppe und katalytische Hydrierung der Azido-Gruppe^{34) 57) 58)} in Gegenwart von Salzsäure lieferte O-Glycyl-serin-hydrochlorid in z. T. guter Ausbeute.

Die direkte Einführung des Azidoacetylrestes in das Hydroxyl von Milchsäure⁵⁷⁾ bzw. Serin³⁴⁾ ist auch mit Azidoacetylchlorid vorgenommen worden. Der N, N-Dibenzyl-glycylrest ist ebenfalls mit Hilfe des Säurechlorides eingeführt worden.

4) Herstellung unter Verwendung von Anhydriden

Zur O-Acylierung von Serin ist auch das Verfahren der "gemischten Anhydride", das im Jahre 1953 von D. A. Johnson⁵⁹⁾ und gleichzeitig und unabhängig von R. L. Barnden und Mitarb.⁶⁰⁾ zur Darstellung von Estern und Säureamiden im Penicillin-

⁺⁾ Vgl. auch Seite 36 N-Acylierung mit N-Carboxyanhydriden.

gebiet herangezogen wurde, angewandt worden. So reagiert das gemischte Anhydrid von Cbzo-glycin mit Isovaleriansäure³⁴⁾ bzw. Kohlensäuremonoäthylester³⁵⁾ schon in der Kälte mit dem Triäthylammonium-salz von Cbzo-serin in Methylenchlorid und liefert in guter Ausbeute O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-serin. Entfernung der schützenden Gruppen durch katalyt. Hydrierung liefert O-Glycyl-serin (bekannt sind die D-, L- und DL-Verbindung).

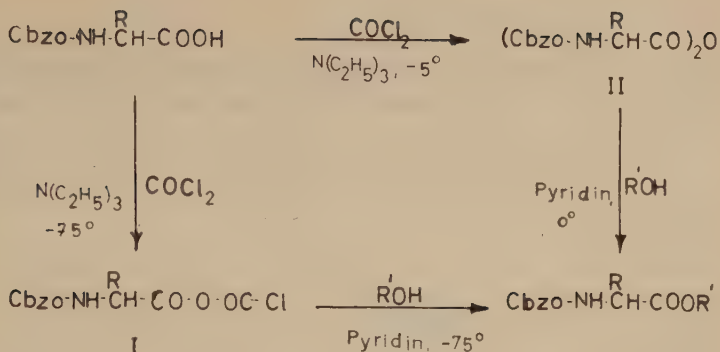
Zur Einführung des Cbzo-Glycyl-Restes in die Hydroxylgruppe von N-acylierten Serinderivaten benutzten wir anfänglich ebenfalls gemischte Anhydride mit Isovaleriansäure³⁴⁾. Bei solchen Anhydriden muß man jedoch immer mit einer parallel laufenden Bildung von Isovaleriansäure-estern rechnen. Auch die einfacher zu handhabenden Anhydride mit Alkylkohlsäuren^{35) 61) 62) 63)} besitzen einen prinzipiellen Nachteil. Aus jeder Molekel des gemischten Anhydrides $\text{RCO-O-COOR}'$ wird bei der Veresterung mit dem Reaktionspartner $\text{R}'\text{-OH}$ eine Molekel Alkohol $\text{R}'\text{-OH}$ frei. $\text{R}'\text{-OH}$ tritt mit $\text{R}'\text{-OH}$ in Konkurrenz. Wo letzteres nicht viel schneller reagiert oder nicht im Überschuß eingesetzt werden kann, erhält man ein unreines Reaktionsprodukt⁺⁾ oder eine schlechte Ausbeute.

Phosgen-Methode

Die Entstehung unerwünschter Ester ist ausgeschlossen, wenn man zur Aktivierung der Carboxyl-Gruppe Phosgen⁴⁶⁾ an Stelle von Chlorameisenestern oder Carbonsäurechloriden⁺⁺⁾ verwendet. Unter geeigneten Bedingungen reagieren die gemischten Anhydride I in guter Ausbeute mit der zu veresternden Hydroxylgruppe, ohne daß es zur Ausbildung symmetrischer Anhydride⁶²⁾ kommt.

+) siehe M. Brenner und Mitarb.⁴⁶⁾, Tabelle 2, Seite 610.

++) überschüssiges Phosgen kann prinzipiell mit der OH-Verbindung einen Kohlensäureester geben. Derselbe besitzt aber in der Regel andere physik. Eigenschaften und tritt kaum störend in Erscheinung.



Auf ähnlicher Basis haben schon A. Einhorn und F. Hollant⁶⁴⁾ β -Naphтол und Eugenol mit niederen Fettsäuren acyliert. Interessesehalber sei noch erwähnt, daß durch direkte Einwirkung von Phosgen auf die Hydroxylgruppen von β -Hydroxy-äthylaminen⁶⁵⁾ und N-acylierten Serinderivaten³⁶⁾ über die O-Chlorocarbonyl-Zwischenstufe durch anschließende Ammonolyse O-Carbamylderivate erhalten werden konnten. Nach diesem Verfahren konnten Skinner und Mitarb.⁸³⁾ das vor einiger Zeit aus Streptomyces-Kulturen isolierte O-Carbamyl-L-serin⁶⁶⁾ synthetisieren.

Unsere experimentellen Bedingungen bei Anwendung der "Phosgen-Methode" ergeben sich allgemein aus dem obigen Schema und sind im experimentellen Teil näher beschrieben. Das Verfahren eignet sich nach unseren Befunden sehr gut zur Cbzo-Aminoacylierung von aromatischen und aliphatischen Hydroxyl-Verbindungen. Wir konnten mit der "Phosgen-Methode"⁴⁶⁾ ohne Schwierigkeiten die folgenden O-(Cbzo-aminoacyl)-N-acyl-serinderivate herstellen:

1. O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-DL-serinamid⁴⁶⁾
2. O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-L-serinamid
3. O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serinamid
4. O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serin⁴⁶⁾
5. O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoylglycyl-DL-serinamid
6. O-(Cbzo-L-phenylalanyl)-L-seryl-glycinamid

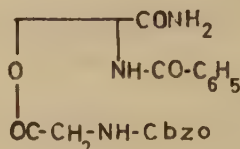
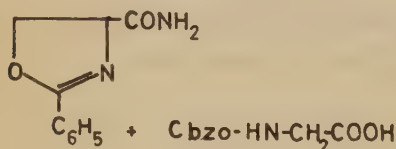
Eine Razemisierung optisch aktiver Komponenten ist bisher nicht beobachtet worden. Selbstverständlich können die gemischten Anhydride I (vgl. oben) auch zur N-Acylierung von Aminosäureestern oder Peptidestern benutzt werden⁴⁶⁾.

Symmetrische Anhydride

Grundsätzlich eignen sich auch die symmetrischen Anhydride II (vgl. Seite 27) zur O-Acylierung. So konnte J. Wehrmüller^{2) 5)} mit dem stabilen Cbzo-Glycin-anhydrid die Veresterung der Hydroxylgruppe von N-Benzoyl- und N-(Cbzo-glycyl)-serinamid sowie von β -Hydroxybuttersäureamid durchführen. Die Rohausbeuten bewegen sich dabei zwischen 70 und 85 %.

5) Herstellung durch Aufspaltung von Oxazolin- und Oxazolonringen

Nach Angaben von E.M. Fry⁶⁷⁾ lassen sich durch Aufspaltung des Oxazolin-ringes mit einer organischen Carbonsäure leicht O,N-diacylierte Serinderivate erhalten. Dabei tritt die Säure an das Sauerstoffatom unter Bildung des entsprechenden Esters. Nach diesem Verfahren konnte J. Wehrmüller²⁾ das 2-Phenyl-4-carbamido-oxazolin durch Zusammenschmelzen mit Cbzo-Glycin zum O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl-serinamid öffnen:



M.M. Botvinik und Mitarb.^{68) 69)} benutzten im beschränkten Maße auch Oxazolone und erhielten eine Reihe von O,N-diacylierten Serin- und Threoninderivaten.

b) N-Benzoylierung von Serin

Das als Ausgangsmaterial benötigte N-Benzoyl-DL-serin erhielten wir nach Sörensen und Andersen³⁸⁾ nach der üblichen Schotten-Baumann-Methodik. Die analoge Benzoylierung von L-Serin in kalter 2n-Natronlauge³⁷⁾ konnte nicht befriedigend durchgeführt werden, wohl aber in Gegenwart von Magnesiumoxyd^{+) 43)}.

⁺⁾ Mitgeteilt von befreundeter industrieller Seite.

Zur Darstellung von N-Benzoyl-L-serin eignet sich in beschränktem Maße auch die Spaltung des Razemats N-Benzoyl-DL-serin über die Brucinsalze nach E.M. Fry⁷⁰⁾.

c) Decarbobenzoxylie rung von O-(Cbzo- α -aminoacyl)-serinderivaten

Zur Abspaltung der Cbzo-Gruppe eignet sich sehr gut die katalyt. Hydrierung im wasserfreien²⁾ bzw. wässrigen³⁴⁾ Milieu in Gegenwart einer starken Säure (Salzbildung), etwa Perchlorsäure⁵⁾ oder Salzsäure^{5) 34)}, ferner die säurekatalysierte Decarbobenzoxylie rung nach C. Harington und T. Mead⁷¹⁾ mit Hilfe von Phosphoniumjodid⁷²⁾. Die auf Seite 27 beschriebenen Cbzo-Verbindungen 1-6 wurden durch katalytische Hydrierung in Eisessig bzw. 70-proz. Äthanol in Gegenwart von Palladium und 1,1 Äquivalent Salzsäure in die stabilen Salze übergeführt. Wir hydrierten vorzüglich in wässrigen Medien, da in wasserfreien Milieus die Aktivität des Palladium-Katalysators durch Chlorwasserstoff beeinträchtigt werden kann. Wir wählten die Hydrochloride wegen ihrer guten Kristallisierbarkeit, der leichten Kontrolle des Entsalzungsvorgangs nach der Umlagerung und dem Ausbleiben von Salzeffekten bei der Papierchromatographie.

d) Diskussion einiger weiterer Möglichkeiten

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Übertragung des Aminoacyl-Einlagerungs-Prinzips auf Derivate aliphatischer β -Hydroxysäureamide, besonders des Serins, ist erreicht worden. Man wird jetzt nach Überwindung der prinzipiellen Schwierigkeiten daran gehen müssen, diese Synthese-Reaktion durch Wahl der geeigneten Ausgangsmaterialien und Umlagerungsbedingungen so ergiebig als möglich zu gestalten.

Zunächst einige Worte zur Wahl der Schutzgruppen. Dieses Problem ist eng mit der Einführung eines Aminoacylrestes in das Hydroxyl des Serins verbunden, indem normalerweise beide α -Aminogruppen, die des Serins bzw. der N-endständigen Aminosäure (I in Schema 3) und diejenige der einzuführenden Aminosäure (II in Schema 3), geschützt werden müssen. Durch selektive Entfernung der Schutzgruppe (II) des O-

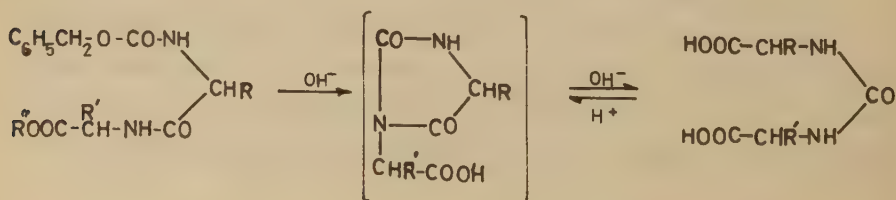
Aminoacylrestes erhält man dann das Ausgangsmaterial für die AAE. Bei Verwendung von N-Carboxyanhydriden von Aminosäuren zur Einführung des Aminoacylrestes erübrigt sich die zweite Schutzgruppe. Das folgende Schema enthält einige Vorschläge zur Wahl der Schutzgruppen.

Schema 3

I	II	Abspaltung von II
Cbzo- Cbzo-	Trityl- N-Carboxyanhydrid	verd. HCl -
Tosyl- Phthaloyl- Phenyl-mercapto-formyl- ⁷³⁾ Benzyl-mercapto-formyl- ⁷³⁾ Butyl -mercapto-formyl- ⁷³⁾	Trityl- Cbzo - N-Carboxyanhydrid	verd. HCl katalyt., HBr/Eisessig -

Die Frage, ob die α -Aminogruppe des Serins nicht etwa frei vorliegen kann, muß noch geprüft werden. In diesem Falle liegt ein System vor, das in alkalischem Milieu prinzipiell nach zwei Richtungen reagieren kann: AAE und $O \rightarrow N$ -Acylwanderung nach Bergmann (vgl. Seite 15). Beide Reaktionen verlaufen rasch. Es ist eine Frage der Geschwindigkeit, welche der beiden zur Hauptreaktion wird.

Zur Synthese der freien Peptide mit aminoendständigem Serin ist die von uns verwendete Benzoylgruppe gänzlich ungeeignet, weil ihre nachträgliche Entfernung mit rein chemischen Methoden eine Zerstörung des ganzen Moleküls zur Folge hat. Die meist verwendete Cbzo-Gruppierung zeigt bekanntlich den Nachteil einer gewissen Alkaliempfindlichkeit. So entstehen als Nebenprodukte bei der Verseifung von N-Cbzo-Dipeptidestern unter Austritt von Benzylalkohol Harnstoff bzw. Hydantoin-derivate.⁷⁴⁾



Ob und in welchem Maße diese Reaktion unter den Bedingungen der Umlagerung bzw. der Aufarbeitung erfolgt, muß das Experiment zeigen. Entsprechende Versuche zur Abklärung dieser Frage werden zur Zeit von U. Beglinger durchgeführt.

Was die Umlagerungsbedingungen betrifft, so läßt sich heute folgendes sagen:

In Gegenwart von Kalium-tert. butylat in tert. Butanol bzw. Dimethylformamid und auch Natriumamid in flüssigem Ammoniak erfolgt die AAE rasch und praktisch ohne nennenswerte Nebenreaktionen, wenn man von einer geringfügigen Spaltung des Esters durch Spuren von Feuchtigkeit absieht. In wässrigem Alkali tritt nach unseren bisherigen Erfahrungen ausschließlich Spaltung der Esterbindung durch Hydrolyse ein. Die Tatsache, daß in Gegenwart von Natriumamid in flüssigem Ammoniak normale AAE erfolgt, läßt vermuten, daß bei gesteigerter Alkalikonzentration, etwa konzentrierte Natronlauge, AAE selbst in wässrigem Medium erfolgen kann. Ein gewisser Nachteil bei Verwendung von Alkoxyd besteht wegen der Möglichkeit von Razemisierungen.

Die Verwendung anderer basischer Agenzien, etwa Natrium-phenolat in Phenol oder gar stark basischer Ionenaustauscher (vollkommen wasserfrei!) in einem geeigneten Lösungsmittel weisen vielleicht neue Wege.

-VERGLEICHSPRÄPARATE-

e) Allgemeine Methoden zur Darstellung von Serinpeptiden

Den in fast allen Proteinen vorkommenden aliphatischen β -Hydroxy- bzw. β -Mercapto- α -aminosäuren Serin, Threonin und Cystein sowie dessen Peptiden wird wachsendes Interesse entgegengebracht. Die Synthese von Hydroxyaminosäure-, insbesondere von Serinpeptiden^{†)} führte erst dann zum Erfolg, als neue, leicht abspaltbare Gruppen zum vorübergehenden Schutz der α -Amino- und β -Hydroxy-Gruppe gefunden worden waren. Man kennt neuerdings aber auch Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung, die einen Schutz der Hydroxygruppe unnötig machen.

^{†)} Nur diese sollen behandelt werden.

1) Temporärer Schutz der β -Hydroxy-Gruppe

Ein vorübergehender Schutz der Hydroxygruppe wird durch Addition von Dihydropyran (Bildung von Tetrahydro-pyranyl-äthern⁷⁸⁾), durch Benzylierung^{79) 80)} und auch durch Acylierung erreicht²⁷⁾. Die Tetrahydropyranyläther sind auf Grund ihres Acetalcharakters beständig gegen Alkali und werden durch Säuren leicht gespalten. B. Iselin und R. Schwyzer⁸¹⁾ stellten eine Reihe von entsprechenden Serin- und Tyrosinderivaten her. Über die Synthese von O-Benzyl-serin, ausgehend von Acrylsäureester, berichtete vor kurzem ein japanischer Autor⁷⁹⁾. Nach W. Grassmann⁸⁰⁾ sollen sich O-Benzyl-N-acyl-serinderivate zur Peptidsynthese gut eignen; der Benzylrest läßt sich gewöhnlich leicht durch katalytische Hydrierung entfernen.

Die O-Alkylderivate wie O-Cyanäthyl-N-benzoyl-serin³⁷⁾, O-Methyl-N-phtaloyl-D-serin (Chloramphenicol-Zwischenprodukt)⁸²⁾ und O-Äthyl-N-phtaloyl-L-serin⁸³⁾ sollen nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Interessant ist im letzteren Falle die Einführung der Phtaloyl-Gruppe via Thiophtalsäure-anhydrid.

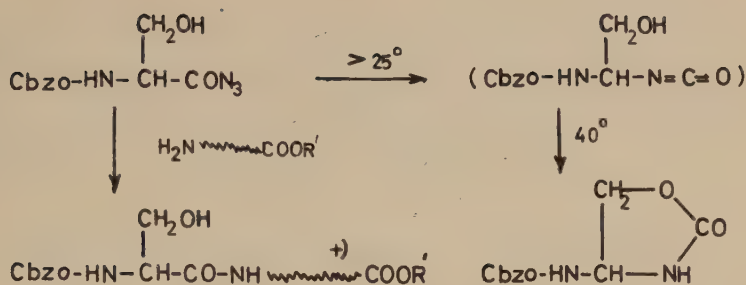
2) Knüpfung der Peptid-Bindung

Von den beiden prinzipiellen Möglichkeiten der Aminosäure-Verknüpfung, nämlich Aktivierung der Carboxyl-Gruppe oder Aktivierung der Amino-Gruppe, ist im Falle von Serinderivaten nur die erste Möglichkeit benutzt worden. Im folgenden seien die Verfahren, die zur Synthese von Serinpeptiden Anwendung fanden, im einzelnen nur kurz besprochen.

Azide

Den Reigen eröffnete J.S. Fruton (1942)⁴¹⁾, indem er zeigte, daß Cbzo-serinazid bei Temperaturen unter 25° mit Aminosäureestern ohne Nebenreaktion zu Cbzo-Dipeptidestern reagiert. Bei höherer Temperatur kann das Azid nach Umlagerung zum Isocyanat mit Aminogruppen unter Harnstoffbildung^{84) 85)} oder mit der benachbarten Hydroxygruppe zum 4-Cbzo-amino-oxazol-2 reagieren.

Nach diesem Verfahren wurden vor allem in den letzten Jahren eine Reihe von



Serinpeptiden vom Typ "Ser-X" erfolgreich dargestellt. Natürlich kann das Azid-Verfahren auch zur Herstellung von Peptiden des Typs "X-Ser" benutzt werden. Als Aminoschutzgruppe fanden die Cbzo-Gruppe^{28) 41) 53) 86) 87) 88) 89) 90) 91) 92)}, die Tosyl-^{85) 93)} und auch die Tosyl-glycyl-Gruppe⁹⁴⁾ Verwendung. Die Azid-Methode eignet sich besonders zur Synthese höherer Peptide. Die folgende Tabelle zeigt Beispiele zur Synthese von Teilstücken von Proteinen mit der natürlichen Anordnung der Aminosäuren. Eine Razemisierung⁹⁵⁾ konnte nicht beobachtet werden.- Vor kurzem wurde entgegen dem bei der Azid-Methode üblichen Verfahren die Reaktion in alkoholischer Lösung^{92) 96)} vorgenommen.

Tabelle V
Synthese von Serinpeptiden nach der Azid-Methode

Peptid ⁺⁺⁾	⁺⁺⁺⁾	Jahr
Dihydro-lysergyl-Ser-Leu-Pro-OCH ₃	Mutterkorn	1952 ⁸⁵⁾
H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-OH	Corticotropin A	1955 ⁸⁹⁾
H-Ser-His-Leu-Val-Glu-OH	Insulin	1956 ⁹⁰⁾
H-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-OH	Fibroin	1957 ^{53) 91)}

^{+))} Diese Darstellungsart siehe G.W. Kenner (97).
⁺⁺⁾ Abkürzungen für Aminosäuren siehe E. Brand und J. T. Edsall⁽¹⁶⁾
⁺⁺⁺⁾ Hergestellt im Zusammenhang mit der Bearbeitung von

Säurechloride

Sie eignen sich zur Gewinnung von Peptiden vom Typ "X-Ser". E. Fischer³⁹⁾ erhielt z.B. über Chloracetyl-serin und dessen Aminolyse Glycylserin. In neuerer Zeit bedienten sich M.M. Botvinik und Mitarb.⁶⁸⁾ der N-Phtaloyl- bzw. der N-Tosyl-glycylchloride und gelangten in Gegenwart von Diäthylanilin zu entsprechenden N-Acyl- bzw. O,N-Diacyl-serinderivaten. Und schließlich acylierten L. Velluz und Mitarb.⁹⁸⁾ Serin mit N,N-Dibenzyl-glycylchlorid und erhielten nach Abhydrieren der Benzylreste Glycylserin.

Gemischte Anhydride

Sie eignen sich zur Herstellung von Peptiden des Typs "Ser-X" oder "X-Ser". L. Velluz und Mitarb.⁹⁸⁾ verwendeten zur Synthese von "X-Ser" gemischte Anhydride des Boissonnas/Wieland/Vaughan-Typs^{61) 62) 63)} von N,N-Dibenzyl-^{99) 100)}, bzw. N-Tritylaminosäuren¹⁰¹⁾, L. Josefsson und P. Edman²⁴⁾, sowie W. Grassmann und Mitarb.⁵⁴⁾ solche von Cbz- α -Aminosäuren. Die Entfernung der N-Benzylreste kann gegebenenfalls durch Wahl der Temperatur stufenweise³⁵⁾ durchgeführt werden. Der Tritylrest läßt sich ebenfalls katalytisch¹⁰²⁾ oder mit verd. Säuren entfernen³⁵⁾ 101) 102) 103).

Auch gemischte Anhydride mit anorganischen Säuren sind vor kurzem mit Erfolg verwendet worden. So erhält man durch Einwirkung von 1 Mol POCl_3 auf eine N-Cbz- α -Aminosäure bei -15° in Gegenwart einer Base ein gemischtes Anhydrid mit Dichlor-phosphorsäure¹⁰⁴⁾, das mit β -Hydroxyaminosäure-peptidestern zum Peptid-derivat reagiert. Das Hydroxyl (Threonin und Hydroxyprolin) bedarf hierbei keines Schutzes. Soweit bisher untersucht, tritt auch keine Razemisierung ein.

Neulich bereiteten G.W. Kenner und Mitarb.¹⁰⁵⁾ über das Li-Salz des gemischten N-Benzoylglycin-schwefelsäureanhydrides in Dimethyl-formamid den N-Benzoyl-glycyl-DL-serinmethylester.

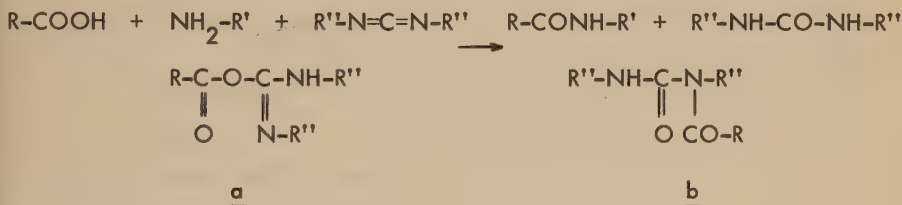
Aktivierte Ester

Zu den bekanntesten Vertretern dieser Klasse gehören die "Cyanmethylester" von R. Schwyzer und Mitarb.¹⁰⁶⁾. Man erhält sie aus N-Acyl-aminosäuren durch

mehrstündiges Erhitzen mit Chloracetonitril in Essigester und Gegenwart einer Base als durchweg kristallisierte Körper. Bei Hydroxyaminosäuren muß auch die Hydroxy-Gruppe geschützt werden. So konnten B. Iselin und R. Schwyzer⁸¹⁾ aus O-(Tetrahydropyranyl)-N-Cbzo-serin (vgl. Seite 32) den entsprechenden Cyanmethylester bereiten; Umsatz mit Benzylamin lieferte in 96 % das Benzylamid.

Carbodiimide

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Carboxyl-Gruppe einer Acylaminosäure und die Amino-Gruppe eines zweiten Aminosäurederivates direkt zu verknüpfen. Hierzu sind nach H.G. Khorana¹⁰⁷⁾ und J.C. Sheehan¹⁰⁸⁾ die Carbodiimide^{109) 110) 111)}, besonders das Dicyclo-hexyl-carbodiimid, geeignet:



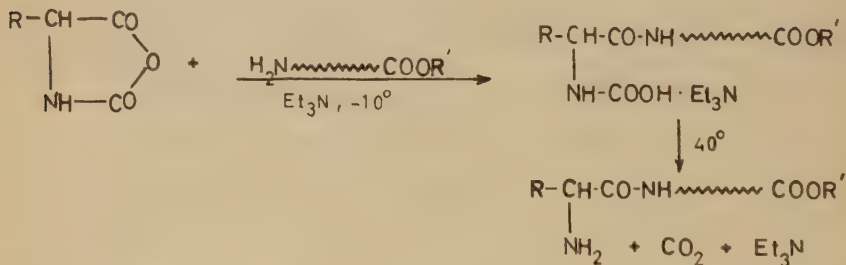
Die Reaktion verläuft wahrscheinlich über ein Zwischenprodukt a, das von der Aminogruppe der zweiten Komponente unter Amid-Bildung gespalten wird. Als unerwünschte Nebenreaktion kann die Bildung des acylierten Harnstoffs b eintreten.

Als besondere Vorteile müssen die geringe Empfindlichkeit gegen Feuchtigkeit^{+) ,} Verzicht auf Schutz der Hydroxygruppe und die Erhaltung der optischen Aktivität erwähnt werden. Nach diesem Verfahren sind eine Reihe von Serin-^{25) 90) 92) 108) 112)}, Threonin-²⁵⁾ und Hydroxyprolinderivate²⁵⁾ des Typs "X-Ser" und "Ser-X" unter Verwendung des Phtaloyl- bzw. Cbzo-Restes dargestellt worden.

^{+) Die Reaktion läßt sich sogar in wässrigem Milieu durchführen.}

N-Carboxyanhydride

Eine Körperklasse, der immer größere Bedeutung zukommt, vor allem auch technisch, sind die N-Carboxyanhydride von Aminosäuren (Leuchs' sche Körper)^{27) 113) 114) 115)}. Unter CO_2 -Abspaltung treten diese Bausteine beim Erhitzen oder in Gegenwart von geeigneten Initiatoren oder Katalysatoren zu mehr oder weniger langen Peptidketten zusammen (Polymerisation)¹¹⁶⁾. Die Synthese kleiner, wohldefinierter Peptide gelang aber erst, als J.L.Bailey^{117) 118)} zeigen konnte, daß Carboxyanhydride mit Aminosäureestern in Gegenwart einer tert. Base¹¹⁹⁾ ohne Polymerisation über carbaminsäure Salze als Zwischenstufe zu Dipeptidderivaten reagieren. Das Verfahren ist umso bemerkenswerter, als keine der beiden Komponenten irgendwelcher Schutzgruppen bedarf.



M. Frankel und H. Halmann²⁷⁾ stellten die inneren Anhydride von O-Acetyl- bzw. O-Cbzo-serin her. Im Gegensatz zu anderen Carboxyanhydriden hydrolysiert das letztere in feuchter Luft zu O-Cbzo-serin. Beide Anhydride polymerisieren beim Erhitzen ($n = 10$ und 5).

O $\rightarrow$ N- Acylwanderung

Vergleiche die Ausführungen Seite 23-24

f) Herstellung der Vergleichspräparate unter Verwendung der Azid-Methode

Es handelt sich hier um die Darstellung der folgenden Verbindungen:

1. DL- β -Hydroxybutyryl-glycinamid⁵⁾
2. N-Benzoyl-DL-seryl-glycinamid
3. N-Benzoyl-glycyl-DL-serinamid
4. N-Benzoyl-L-seryl-glycinamid
5. N-Benzoyl-glycyl-DL-seryl-glycinamid⁺)
6. N-Benzoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycinamid

Wir können uns hier kurz fassen. Serinhaltige N-Benzoyl-peptidderivate sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden, bis auf den in jüngster Zeit von G. W. Kenner und Mirarb.¹⁰⁵⁾ beschriebenen N-Benzoyl-glycyl-DL-serinmethylester (vgl. Seite 34, gemischte Anhydride).

Zur Darstellung der oben beschriebenen Vergleichspräparate 1-6 benutzten wir das bewährte Azid-Verfahren (vgl. Seite 32, Azide). Wir setzten N-Benzoyl-serinazid in wässrigem Milieu mit dem Na-Salz²⁾ der zweiten Komponente nach Schotten-Baumann bei 0° um, oder in wasserfreien Milieus nach J.S. Fruton^{41) 86)} mit dem entsprechenden Aminosäureester bei Zimmertemperatur bzw. nach K. Rüfenacht⁹⁶⁾ bei 0°.

Zur Darstellung des isomeren N-Benzoyl-glycyl-serins benutzten wir die von Th. Curtius für das entsprechende Iso-serin-derivat¹²⁰⁾ angegebene Vorschrift; aus N-Benzoyl-glycinazid und Serin in alkalischer Lösung bei 65° entstand das Hippuryl-serin in 70 % Ausbeute. Die N-Benzoyl-dipeptide wurden mit Diazomethan verestert⁺⁺⁾ und die Ester mit methanolischer Ammoniak-Lösung wie gewohnt in die Amide⁺⁺⁾ übergeführt.

+) Siehe Seite 14

++) Vgl. experimenteller Teil Seite 40

EXPERIMENTELLER TEIL

1) ÜBERSICHT ÜBER EINIGE PRÄPARATIVE UND ANALYTISCHE METHODEN

Die Schmelzpunkte sind auf einem Kofler-Block bestimmt und korrigiert worden; Fehlergrenze ca. $\pm 2^\circ$. Wo nichts anderes bemerkt wird, sind die Analysensubstanzen 14 Stunden im Hochvakuum, etwa 50° unter ihrem Schmelzpunkt, aber nie höher wie 95° , getrocknet worden.

A) ALLGEMEINES ÜBER VERESTERUNG, AMMONOLYSE UND HYDRAZINOLYSE

1) Veresterung mit Diazomethan

Die zu veresternde Säure wird in der 20 bis 30-fachen Menge an abs. Methanol⁺ bzw. Äther gelöst und unter Rühren bei ca. 15° portionenweise mit ätherischer Diazomethan-Lösung (ca. 0,5 Mol/l)¹²¹⁾ bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Zerstörung des überschüssigen Diazomethans durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig wird die farblose Lösung im Vakuum zur Trockene verdampft und der erhaltene Methylester aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert. Ausbeute: Praktisch quantitativ.

2) Ammonolyse von Methylestern

Man löst den entsprechenden Methylester in der 20- bis 30-fachen Menge an abs. Methanol⁺, leitet bei 0° unter Ausschluß von Feuchtigkeit trockenes Ammoniak-Gas⁺⁺⁾ bis zur Sättigung ein (30 bis 60 Minuten) und läßt das Gemisch verschlossen, am besten in einer gesicherten Bügelflasche, 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Der nach Eindampfen im Vakuum verbleibende kristalline Rückstand wird (nach evt. Behandlung mit Tierkohle) aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert. Ausbeute: 80 bis 90 %.

⁺) Nach N. Bjerrum und L. Zechmeister¹²²⁾

⁺⁺⁾ Trockenturm, gefüllt mit techn. Natriumhydroxyd-Schuppen.

3) Hydrazinolyse von Methylestern

1 m Mol Methylester wird bei ca. 35° in einem Minimum an abs.⁺⁾ Methanol gelöst und mit ca. 5 m Mol Hydrazinhydrat versetzt. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur werden die ausgeschiedenen farblosen Kristalle abgesaugt, mit Methanol gewaschen und aus Alkohol bzw. Alkohol/Äther umkristallisiert. Ausbeute: 75 bis 90 %.

B) ANALYTISCHE METHODEN

1) Papierchromatographische Kontrolle

Zur raschen Feststellung von Ausgangsmaterial, Endprodukt und evt. Spaltprodukten benutzen wir die von L. Rutter¹²³⁾ angegebene Rundfiltertechnik in etwas abgeänderter Form⁵⁾. Für genauere Untersuchungen diene die Methode der aufsteigenden Chromatographie nach R.J. Williams und H. Kirby¹²⁴⁾. Einen Zusammenhang der R_f -Werte von Aminosäuren bei linearer und sektorenförmiger Ausbreitung geben H.C. Chakraborty und D.P. Burma¹²⁵⁾ mit der Formel (mit theoretischer Ableitung):

$$R_{f, \text{ linear}} = (R_{f, \text{ sektorenf.}})^2,$$

wobei die R_f -Werte bei der absteigenden Methode etwas kleiner sind wie die nach der aufsteigenden Methode. Bei sektorenförmigem Ausbreiten sind die R_f -Werte beträchtlich höher; sie hängen etwas vom Sektorenwinkel ab.

Aminosäuren, Peptide und zusätzlich ihre N-Acylderivate, in unserem Falle besonders die Amide, werden mit der Chlorierungs-Methode nach F. Reindel und W. Hoppe¹²⁶⁾ erfaßt. Durch Einwirken von gasförmigem Halogen, besonders Chlor⁺⁺⁾, wird die Peptid-Bindung in die Chloramidform übergeführt, und diese liefert auf dem Papier mit geeigneten Redoxindikatoren (Benzidin, Tolidin) tieffarbige unlösliche Farbflecken auf weißem Grund. Der Nachweis ist sehr empfindlich und kann auch

⁺⁾ nach N. Bjerrum und L. Zechmeister¹²²⁾

⁺⁺⁾nach J. Wehrmüller eignet sich auch Brom.

quantitativ genutzt werden. Freie Aminosäuren, wie Peptide und O-Aminoacyl-Derivate von Hydroxysäuren sind natürlich auch mit Ninhydrin und diazotierter Sulfanilsäure¹²⁷⁾ nachweisbar. Die Kombination beider Verfahren erwies sich als sehr nützlich.

Die besten Resultate erzielten wir mit Whatman Nr. 1-Papier (Höhe der Bögen 28 bis 32 cm) und folgenden Lösungsmittelsystemen:

70-proz.- n-Propanol, 90-proz.- n-Propanol¹²⁸⁾

n-Butanol/Eisessig/Wasser, 4/1/5 (v/v),

wobei das letztere wegen seiner bekannten chemischen Unbeständigkeit von Zeit zu Zeit frisch bereitet werden sollte. Im einzelnen verfahren wir wie folgt:

Die bei Zimmertemperatur oder erhöhter Temperatur getrockneten Chromatogramme⁺⁾ werden in einer mit einer Glasplatte abgedeckten Wanne, flach auf Glasnägeln liegend, während 3 bis 5 Minuten einer Chloratmosphäre ausgesetzt (erzeugt durch Zusammengießen gleicher Volumina von 2%-iger KMnO_4 -Lösung und 10%-iger Salzsäure)⁺⁺⁾ und dann sofort durch Besprühen mit einem Reagenz, bestehend aus gleichen Volumteilen einer gesättigten Lösung von o-Tolidin in 2%-iger Essigsäure und m/20-Kaliumjodid-Lösung, entwickelt. Zur Entfernung von überschüssigem Reagenz wird kurz mit 2%-iger Essigsäure und dann mit Wasser gewaschen, der Bogen z.B. auf eine Glasscheibe aufgelegt und die blauschwarzen Flecken in feuchtem Zustand (erhöhte Empfindlichkeit) sofort markiert, am besten mit einem Kugelschreiber. Um ein rasches Ausbleichen der Flecken zu verhindern, sollten die Chromatogramme bei Zimmertemperatur getrocknet werden.

Eine Variante besteht darin, daß auch bereits mit Ninhydrin entwickelte Chromatogramme normal chloriert werden können, wobei die Ninhydrinfarbe nach

⁺⁾ Beladung: Aminosäuren, Peptide: 10 bis 20 γ
Acylaminosäuren, Acylpeptidamide: 20 bis 40 γ
bei der Rundfiltertechnik jeweils die Hälfte der Angaben.

⁺⁺⁾ Die von den Autoren¹²⁶⁾ empfohlene Befeuchtung der Chromatogramme mit Aceton/Alkohol 1/1 hat sich als überflüssig erwiesen.

2 bis 3 Minuten ausbleicht. Zweckmäßigerweise verfertigt man sich vor dem Chlorieren ein Bild des mit Ninhydrin entwickelten Chromatogramms. Dazu werden Start, Flecken und die Lösungsmittel-Front auf ein definiert aufgelegtes Pergamin-Papier in der Durchsicht genau übertragen. Durch Ergänzung nach erfolgter Chlorierung und Entwicklung (in einer anderen Farbe) erhält man in natürlicher Größe ein haltbares Bild, das durch Angabe folgender Daten (als Stempel)¹²⁹⁾ alles Wissenswerte enthält.

Vers.:	Chrom.:	Datum:
Objekt:		
Methode: auf/ab, ein-, zwei-, dim.		
Papier: SS, Wh., Zeit:		
Lös.-M.: 1. 2.		
Aufgetr. Menge: Lsg.:		
Nachweisreagens:		
Bemerkg.:		

In der folgenden Tabelle VI sind die R_f -Werte einer Reihe von Verbindungen wiedergegeben, die im Zusammenhang mit den Umlagerungsversuchen zur raschen Identifizierung der entstandenen Produkte dienen.

Tabelle VI

R_f -Werte⁺⁺⁺⁾ (Aufsteigende Methode)¹²⁴⁾

Verbindung	n-PrOH 70 %	n-PrOH 90 %	B/E/W ⁺⁺⁾
β -Hydroxybuttersäureamid	0,70	-	-
β -Hydroxybutyryl-glycinamid	0,59	-	-
O-Glycyl- β -Hydroxybuttersäureamid ⁺⁾	0,45	-	-
N-Benzoyl-serinamid	0,89	0,73	0,71
N-Benzoyl-seryl-glycinamid	0,80	0,57	0,66
O-Glycyl-N-benzoyl-serinamid ⁺⁾	0,64	0,30	0,42
N-Benzoyl-glycyl-serinamid	0,73	0,55	0,67
N-Benzoyl-glycyl-seryl-glycinamid	0,65	0,36	0,57
O-Glycyl-N-benzoyl-glycyl-serinamid ⁺⁾	0,50		0,35
N-Benzoyl-seryl-phenyl-alanyl-glycinamid ⁺⁾	0,90	-	-
O-Phenylalanyl-N-benzoyl-seryl-glycinamid ⁺⁾	0,80	0,84	0,67
Glycin	0,26	0,06	0,18
Glycin-diketopiperazin	0,44	-	-
N-Benzoyl-glycin	-	-	0,85
Phenylalanin	0,61	0,26	0,55

+) ++) +++) Erklärungen Seite 44

2) Total- und Partialhydrolyse von Serinpeptidderivaten

a) Totalhydrolyse

2 bis 3 mg Peptidderivat, gelöst in ca. 3 ml Salzsäure, 1:1, werden über Nacht im Bombenrohr bei 130° hydrolysiert. Dann wird im Vakuum zur Trockene verdampft. Zur Entfernung von überschüssiger Salzsäure wird wiederholt mit wenig Wasser versetzt und erneut eingedampft. Der Rückstand, gelöst in ca. 0,5 ml, wird direkt chromatographiert. Für die Trennung von Glycin und Serin eignet sich am besten Phenol/Wasser, 80 : 20.

b) Partialhydrolyse

2 bis 3 mg Peptidderivat werden in ca. 2 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und 1 bis 48 Stunden bei Zimmertemperatur bzw. 37° 53) 130) 131) stehen gelassen. Im übrigen wird wie oben verfahren.

II. SYNTHESE DER AUSGANGSMATERIALIEN

A) O-ACYLIERUNG NACH DER METHODE DER GEMISCHTEN ANHYDRIDE MIT ISOVALERIANsäURE 34)

O-(Cbzo-glycyl)-DL-β-hydroxybuttersäureamid

Zu einer Lösung von 2,08 g (10 m Mol) Cbzo-glycin⁴²⁾ und 1,39 ml (10 m Mol) Triäthylamin in 16 ml abs. Methylenchlorid⁴¹⁾ tropft man innert 20 Minuten bei -5° unter Rühren und Ausschluß von Feuchtigkeit eine Lösung von 1,2 ml (10 m Mol) Isovaleriansäurechlorid¹³²⁾ in 3 ml Methylenchlorid. Man hält 2 Stunden bei derselben

+) 1 Stunde über P₂O₅ unter Rückfluß erhitzt und über P₂O₅ abdestilliert.

Erklärungen zu Tabelle VI:

- +) freie Base und Monohydrochlorid verhalten sich gleich.
- ++) n-PrOH = n-Propanol, B/E/W = n-Butanol/Eisessig/Wasser 4/1/5, die Systeme 90% Propanol und B/E/W benötigen beim Laufen über Nacht (Whatman Nr. 1) eine Bogenhöhe von ca. 30 cm.
- +++) Für die Bestimmung der R_f-Werte ist der Schwerpunkt eines Fleckens maßgebend.

Temperatur, gibt dann auf einmal eine vorgekühlte Lösung von 1,04 (10 m Mol) DL- β -Hydroxybuttersäureamid¹³³⁾ in 15 ml abs. Pyridin zu und rührt während 8 Stunden bei 0°.

Nach Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur wird Eis zugesetzt und nach etwa einer Stunde werden die leichtflüchtigen Teile bei 35 bis 40° im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird zwischen Essigester und 2n Salzsäure verteilt, die Essigesterlösung mit 2n Salzsäure, danach mit 10%-iger Kalium-hydrogencarbonatlösung extrahiert und mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Essigester im Vakuum verdampft und der ölige Rückstand (61 %) zur Reinigung zwei mal aus Essigester/Petroläther (Wärmebad) umkristallisiert. Ausbeute: 1,45 gr (50 %), Smp. 77-78°, Nadelbüschel⁺).

B) O-ACYLIERUNG VON SERINDERIVATEN NACH DER "PHOSGEN - METHODE"⁴⁶⁾

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Man fügt zur Lösung von 1 m Mol Cbzo-Aminosäure und 1,1 m Mol Triäthylamin in 5 bis 10 ml abs. Tetrahydrofuran bei -70°⁺⁺⁾ 1,4 m Mol Phosgen in Toluol (ca. 2 bis 2,5 m Mol Phosgen/ml Lösung)⁴⁶⁾. Vorkühlung der Phosgenlösung ist unnötig. Es fällt sofort Triäthylamin-hydrochlorid aus. Nach 20 Minuten wird auf einmal die gekühlte Lösung der zu acylierenden Komponente (0,5 bis 2 m Mol) (man wählt je nach der Kostbarkeit des Materials und den Möglichkeiten der Aufarbeitung einen Unterschuß oder einen Überschuß der zu acylierenden Komponente) in etwa 5 bis 20 ml abs. Pyridin zugesetzt. Bei der Vorkühlung dieser Lösung geht man so tief als möglich. Wir haben vorzugsweise auf Temperaturen zwischen -20 und -60° gekühlt und bei ungenügender Pyridinlöslichkeit ca. 20 % Dimethylformamid

⁺⁾ Diese Verbindung ist bereits von J. Wehrmüller⁵⁾ durch Verwendung von Cbzo-Glycinanhydrid erhalten worden. Ausbeute 65 %, Smp. 78 - 79°.

⁺⁺⁾ Kältebad: Toluol/Trockeneis.

zugesezt⁺⁾ . Nach gutem Durchmischen wird das Kältebad entfernt und das Reaktionsgemisch über Nacht bei 0° aufbewahrt.

a) Aufarbeitung auf Neutralkörper

Zur Aufarbeitung des schwach gelb bis manchmal rot gefärbten Reaktionsgemisches werden die leicht flüchtigen Anteile im Vakuum bei 30 bis 35° Badtemperatur entfernt und der ölige Rückstand zwischen Essigester und 2n Salzsäure verteilt. Die Essigesterlösung wird mit 2n Salzsäure, danach mit 10%-iger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, mit Wasser neutral gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat der Essigester im Vakuum verdampft. Der verbleibende kristalline Rückstand wird zur Reinigung und Analyse aus einem geeigneten Lösungsmittel kristallisiert. Ausbeute: 40 bis 80 %.

b) Aufarbeitung auf Säure (durch "alternierendes Schütteln")

Nach Entfernen der leicht flüchtigen Anteile im Vakuum wird wie oben zwischen Essigester und 2n Salzsäure verteilt, die Essigesterlösung zuerst mit 2n Salzsäure und dann mit kalt gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung⁺⁺⁾ extrahiert, bis sich beim Ansäuern der wässrigen Phase keine Ausgangs-Cbzo-Säure mehr nachweisen läßt. Nun wird abwechselnd mit gleichen Volumina Wasser und gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung geschüttelt und die entsprechenden Extrakte getrennt gesammelt. Beim Ansäuern des wässrigen Extraktes mit wenig Salzsäure auf Kongo, fällt das Kupplungsprodukt als farbloses Öl an. Es wird in Essigester aufgenommen, mit Wasser, bzw. gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und der Essigester nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum verdampft und im übrigen wie unter a) verfahren.

Tabelle VII (vgl. Seite 47) enthält eine Zusammenstellung von Estern, die wir mit Hilfe der Phosgenmethode ohne Schwierigkeiten herstellen konnten.

⁺⁾ siehe Tabelle VII, Seite 47

⁺⁺⁾ Bei Ausbildung von 3 Phasen (!) muß solange gesättigte Hydrogencarbonatlösung hinzugefügt werden, bis nur noch 2 Phasen verbleiben.

Tabelle VII

O-(Cbzo-Aminoacyl)-serinamidderivate, erhalten nach der "Phosgen-Methode"

Nr.	Verbindung	Cbzo- säure in m Mol	Phosgen in m Mol	ml THF ⁺	OH-Ver- bindung in m Mol	ml Pyridin	ml DMFA ⁺
1.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl- DL-serinamid ⁺⁺	16	23	22	8	40	-
2.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl- L-serinamid	4	5,5	10	3	6	1,5
3.	O-(Cbzo-glycyl)-N-benzoyl- glycyl-DL-serinamid	4	5,6	10	2,4	4,2	3
4.	O-(N-Cbzo-L-phenylalanyl)- N-benzoyl-L-seryl-glycinamid	2	2,8	10	2,4	4,2	-

(Fortsetzung)

Nr.	Umkrist. aus	Ausbeute in % (roh)	Smp.	Habitus	[α] _D	Ber.: Gef.:			
						C	H	O	N
1.	Aceton/Petroläther	75 (86)	141-142°	-	-	-	-	-	-
2.	Methanol/Äther	70 (90)	167-168°	Nadeln	+15,2° (c=0,5 HOAc; 25°)	60,14 60,34	5,30 5,34	-	10,52 10,44
3.	Methanol/Äther	75 (90)	180-181°	kleine Drusen	-	57,89 58,16	5,30 5,59	24,54 24,57	12,28 12,49
4.	Tetrahydro- furan/PAe ⁺	40 (51)	188 ⁺⁺⁺	kleine Nadeln	-10,5° (c=0,63 THF; 23°)	63,72 63,56	5,53 5,70	20,49 20,62	10,25 9,95

⁺)

THF = Tetrahydrofuran; DMFA = Dimethylformamid; PAe = Petroläther (Fraktion 45 bis 55°).

⁺⁺) Diese Verbindung ist bereits von J. Wehrmüller (5) durch Verwendung von Cbzo-Glycinanhydrid erhalten worden. Smp. 138-140° (59%)

⁺⁺⁺) Fällt leicht gallertartig aus.

C) AUSGANGSSTOFFE FÜR DIE HERSTELLUNG DER UNTER II/B GENANN-
TEN VERBINDUNGEN (vgl. Tabelle VII)

Cbzo-Aminosäuren: Cbzo-Glycin⁴²⁾, Cbzo-L-Phenylalanin¹³⁴⁾

N-Acyl-serinamide:

- 1) N-Benzoyl-DL-serinamid⁴⁶⁾.
- 2) N-Benzoyl-L-serinamid.

a) N-Benzoyl-L-serin

Nach Schotten-Baumann⁺⁾ : 10,5 g (0,1 Mol) L-serin⁺⁺⁾, gelöst in 100 ml Wasser, werden mit 10 g (0,25 Mol) Magnesiumoxyd versetzt und das Ganze auf dem Wasserbad kurz erwärmt. Man kühlt im Eisbad ab und tropft bei 0 bis 5° unter Rühren 12,6 ml (0,105 Mol) Benzoyl-chlorid in 50 ml Aceton innert einer Stunde ein. Nach Entfernen des Acetons im Vakuum wird mit konzentrierter Salzsäure auf Kongo angestäuert, die klare (manchmal grünliche) Lösung mit Äther gewaschen und die wässrige Phase im Vakuum bei ca. 50° auf ein Drittel ihres ursprünglichen Volumens eingeeengt. Die ausfallenden Kristalle werden durch Erhitzen und evt. Zusatz von wenig Wasser wieder in Lösung gebracht und die heiße Lösung der Kristallisation überlassen. Ausbeute: 10 g (50 %), Smp. 149-150°, Prismen. $[\alpha]_D^{24} = +45,6^\circ \pm 1^\circ$ (c = 1, EtOH 95 %⁺⁺⁺⁾).

Durch weiteres Einengen und Stehenlassen der Mutterlauge kann noch eine zweite Fraktion gewonnen werden (5 bis 15 %).

⁺⁾ Mitgeteilt von befreundeter industrieller Seite.

⁺⁺⁾ L-Serin: $[\alpha]_D^{25} = +14,5^\circ$ (c = 5, in HCl),
(Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel)

⁺⁺⁺⁾ H. Zahn und W. Gerstner (37) geben für N-Benzoyl-L-serin einen Smp. 122° und eine Drehung von $= +48,5^\circ$ (c = 1, EtOH 95 %);
E.M. Fry (104) zwei Smp. 130 und 147-148,8°, $= +43,6^\circ$ (c = 1, EtOH 95 %).

Durch Razematspaltung nach E. M. Fry^{+) 70)}: Ein Gemisch von 1,5 g (7,2 mMol) feingepulvertem N-Benzoyl-DL-serin³⁸⁾ und 2,85 g (7,2 mMol) Brucin⁺⁺⁾, beides über Phosphorpentoxyd getrocknet, wird im 30 ml Kochglas in 2,5 ml warmem abs. Methanol gelöst. Nach Zugabe von 25 ml abs. Aceton und gutem Durchmischen wird die gelbliche Lösung mit N-Benzoyl-L-serin-brucinsalz angeimpft und während 14 bis 16 Stunden bei Zimmertemperatur (22-24°) stehen gelassen. Das L-Salz scheidet sich als zusammenhängende Kristallmasse an der Wand des Glases ab. Die überstehende Lösung wird in ein neues Glas abgegossen (liefert in 2 bis 4 Wochen eine zweite Fraktion an L-Salz, II), die Kristalle mit wenig Methanol/Aceton 1/10 gewaschen und aus dem gleichen Lösungsmittel umkristallisiert. Ausbeute: 1 bis 1,4 g, das sind 45 bis 65 % der Theorie an L-Salz, Smp. unscharf¹²⁴⁾. Aus dieser zweiten Mutterlauge konnte auch eine kleine Menge an reinem D-Salz (Ia, Tab. VIII) gewonnen werden.

Spaltung mit Alkali⁷⁰⁾: N-Benzoyl-L-serin, in farblosen Prismen. Das Ergebnis eines Versuches mit 10 kleinen Ansätzen, wie eben beschrieben, ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

⁺⁾ Da die Angaben von E.M. Fry betreffs diese Spaltung außerordentlich knapp sind, geben wir unsere Arbeitsvorschrift genau wieder.

⁺⁺⁾ Brucin, wasserfreie Base (Fluka A.G., Buchs).

Tabelle VIII

N-Benzoyl-L-serin durch Razematspaltung

Fraktion	N-Benzoyl-L-serin-brucinsalz in g		N-Benzoyl-L-serin in g	Smp.	Drehung (c = 1, EtOH 95 %) 24°
	roh	rekrist.			
I (n. 14-16 Stunden)	13,4 (61 %)	11,0 (49 %)	2,93 (39 %)	149,5- 150,5°	+ 45,0°
II (n. 3-4 Wochen)	3,5 (16 %)	2,76 (13,0 %)	0,72 (9,6 %)	148 - 151°	+ 45,0°
Ia	1,5 g D-Salz		0,3 g D-Form	148 - 151°	- 45,0°

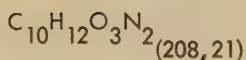
Anmerkung: Zum Umkristallisieren von 14,9 g L-Salz wurde dasselbe in 7,5 ml warmem Methanol gelöst und mit 75 ml Aceton versetzt.

b) N-Benzoyl-L-serinmethylester nach E.M. Fry⁷⁰⁾

Ausbeute: 80 %, Smp. 84-85°, Nadeln (Benzol), $[\alpha]_D^{26} = +16,2^\circ \pm 1^\circ$
(c = 1, EtOH 95 %).⁺⁾

c) N-Benzoyl-L-serinamid: Durch Aminolyse⁺⁺⁾ des Methylesters

Ausbeute: 83 %, Smp. 174-176°, Nadeln (Methanol/Äther). $[\alpha]_D^{25} = +58^\circ \pm 1^\circ$
(c = 1, EtOH 95 %).



Ber. : C 57,68 H 5,81 N 13,45 %
Gef.: C 57,57 H 6,07 N 13,36 %

⁺⁾ Lit. Smp. 84-86° (Benzol), $[\alpha]_D^{26} = +17,7^\circ$ (c = 1, EtOH 95 %).

⁺⁺⁾ vgl. Seite 40

3) N-Benzoyl-glycyl-DL-serinamid

a) N-Benzoyl-glycyl-DL-serin¹²⁰⁾

3,7 g (35 m Mol) DL-Serin werden in 12 ml Wasser gelöst und mit 2n Natronlauge (ca. 17 ml) schwach alkalisch gemacht. Unter Rühren trägt man in die auf 65° erwärmte Lösung portionenweise 8 g (39 m Mol) frisch hergestelltes, noch feuchtes Hippursäureazid¹³⁵⁾ ein. Durch tropfenweises Zugabe von 2n Natronlauge wird die Lösung schwach alkalisch gehalten. Nach 40 bis 60 Minuten läßt man erkalten, filtriert und säuert mit konzentrierter Salzsäure auf Kongo an. Die farblosen Kristalle werden nach zwölfstündigem Stehen im Kühlschrank abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und zweimal aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 6,5 g (70 %), Smp. 167-169°, Prismen. Zur Analyse wird noch zweimal aus Methanol/Äther umkristallisiert und über Phosphorpentoxyd getrocknet (Smp. 171-173°).

$C_{12}H_{14}O_5N_2$ (266,25)	Ber. :	C 54,13	H 5,30	N 10,52 %
	Gef.:	C 54,08	H 5,49	N 10,45 %

b) N-Benzoyl-glycyl-DL-serinamid

Die oben erhaltene Säure wird mit Diazomethan⁺⁾ verestert und ohne Isolierung⁺⁺⁾ der Aminolyse⁺⁾ unterworfen. Ausbeute: 80 %, kurze geriefte Prismen (Methanol/Essigester).

$C_{12}H_{15}O_4N_3$ (265,26)	Ber. :	C 54,33	H 5,70	N 15,84 %
	Gef.:	C 54,60	H 5,79	N 15,84 %

4) N-Benzoyl-L-seryl-glycinamid⁺⁺⁺⁾

^{+))} Siehe Seite 40.

^{++))} Der Methylester ist kürzlich von G.W. Kenner¹⁰⁵⁾ als Monohydrat beschrieben worden. Smp. 89-90° (EtOH/Petroläther).

⁺⁺⁺⁾ durch Umlagerung, vgl. Seite 57, Tab. XI, und als Vergleichspräparat, siehe Seite 58, Tab. XII.

D) O-(α -AMINOACYL)- β -HYDROXYCARBONSÄUREAMIDE DURCH
HYDROGENOLYSE DER UNTER II/B GENANNTEN VERBINDUNGEN

Allgemeine Arbeitsvorschrift

a) Hydrogenolyse in wässrigem Alkohol

2mMol Cbzo-Verbindung, gelöst in 50 ml Äthanol und 23 ml dest. Wasser, werden in Gegenwart von 2,2 ml 1n Salzsäure und 200 mg 10 %-iger Palladium-Kohle¹³⁶⁾ während 60 bis 90 Minuten bei Zimmertemperatur mit Wasserstoff behandelt, bis die CO₂-Entwicklung aufhört. Man filtriert, verdampft das Lösungsmittel im Vakuum bei ca. 30° Badtemperatur und trocknet den verbleibenden farblosen Schaum während 15 Stunden im Exsikkator über Phosphorpentoxyd. Das Hydrochlorid kristallisiert aus Methanol/Äther in farblosen Nadelbüscheln. Ausbeute: 80 bis 95 %.

b) Hydrogenolyse in Eisessig

1 mMol Cbzo-Verbindung wird in 60 ml Eisessig gelöst und nach Zugabe von 1,1 ml 1n Salzsäure und 150 mg 10% -iger Palladium-Kohle¹³⁶⁾ während 60 Minuten bei 20 bis 40° mit Wasserstoff behandelt. Man filtriert und verfährt wie unter a).

Tabelle IX enthält eine Zusammenstellung der Verbindungen, die nach diesen beiden Verfahren dargestellt wurden.

Hydrochloride von O-Aminoacyl-Derivaten von β -Hydroxybuttersäureamid und Serinamid, erhalten durch Hydrogenolyse der Cbz-Verbindungen

Nr.	Verbindung	LM ^{d)} %	Krist. aus	Smp.	Habitus	Ber.: %				
						Gef.: %				
						C	H	O	N	Cl
1.	O-Glycyl-DL- β -hydroxy-buttersäureamid-hydrochlorid (XVIII ^{c)}	E (80)	Methanol/ Essigester	145-146° Zers.	Drusen	36,65 36,98	6,66 6,74	-	14,25 14,12	18,03 17,88
2.	O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinamid-hydrochlorid (XX ^{d)}	A (95)	Methanol/ Äther	162-164° Zers.	Nadeln	47,77 47,55	5,34 5,20	21,21 20,96	-	11,75 10,81
3.	O-Glycyl-N-benzoyl-L-serinamid-hydrochlorid (XXIX)	A (85)	Methanol/ Essigester	188-190° Zers.	Nadeln ^{b)}	47,77 47,50	5,34 5,34	21,21 20,85	-	11,75 11,18
4.	O-Glycyl-N-benzoyl-glycyl-DL-serinamid-hydrochlorid (XXXI)	A (80)	Methanol/ Essigester	160-162° Zers.	Nadeln	46,86 46,92	5,34 5,23	22,30 22,32	-	9,88 9,64
5.	O-(L-Phenylalanyl)-N-benzoyl-L-seryl-glycinamid-hydrochlorid (XXXIII)	E (85)	-	-	Öl	-	-	-	-	-

a) LM = Lösungsmittel, in dem die Hydrierung durchgeführt wurde. A = 70-80 %-iger Äthylalkohol, E = Eisessig, (%) = Ausbeute in %.

b) Drehung: $[\alpha]_D^{26} = +33^\circ \pm 1,5^\circ$ (c = 0,7; 1n-Salzsäure).

c) Hydrojodid: Gerade abgeschnittene Balken, Smp. 143-144,5°.

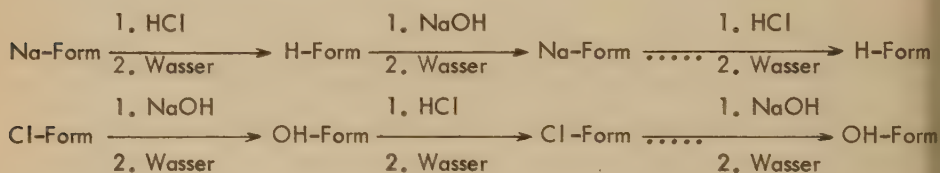
d) Perchlorat: Fbl. Nadeln, Smp. 128-131°, sehr hygroskopisch²⁾

Eigenschaften der Hydrochloride: leicht löslich in Wasser (bis auf 5), Methanol; löslich in Äthanol, Dimethylformamid; wenig löslich in Chloroform, Essigester, tert. Butanol und Äther, wohl aber als freie Base bei Zugabe von Triäthylamin. R_f - Werte s. Tab. VI, Seite 43.

III) UMLAGERUNG VON O- α -AMINOACYL- β -HYDROXY - SÄUREAMIDEN ZU DEN ENTSPRECHENDEN β -HYDROXY- ACYL- α -AMINOSÄUREAMIDEN

1. Vorbereitung der Ionenaustauscher

Saurer Ionenaustauscher Amberlite IR-120 in Form des Natriumsalzes⁺⁾ und basischer Ionenaustauscher Amberlite IRA-400 in Form des Chlorides⁺⁾ , beide gepulvert, werden durch ein- bis zweitägiges Stehen in destilliertem Wasser bei Zimmertemperatur gequollen. Zur Überführung des sauren Austauschers in die H-Form, des basischen Austauschers in die OH-Form und zur Reinigung des Harzes wird dasselbe auf eine Säule gebracht und durch Behandlung mit 2n Salzsäure bzw. 2n Natronlauge nach folgendem Schema 2-3 mal umgeladen,



wobei zwischen jeder Operation mit destilliertem Wasser neutral gewaschen werden muß. Im Falle von Amberlite IRA-400 muß wegen der CO₂-Empfindlichkeit ausgekochtes Wasser und carbonatfreie Natronlauge verwendet werden. Von der Vollständigkeit des jeweiligen Austausches überzeugt man sich durch Prüfung auf Chlor mit Silbernitratlösung und auf Natrium mit Hilfe der Flammenfärbung. Die auf diese Weise vorbereiteten Harze werden in tert. Butanol/Wasser 1:1 suspendiert und sind verwendungsfähig.

2. Lösungsmittel und Base

Abs. tert. Butanol¹³⁷⁾
abs. Dimethylformamid⁴⁺⁾,
trockener flüssiger Ammoniak.

⁺⁾ Handelsüblich

⁴⁺⁾ Über P₂O₅ destilliert.

1 n Kalium-tert.butylat in tert. Butanol¹³⁷⁾ (Gehaltsbestimmung durch Titration mit 1 n Salzsäure gegen Phenolphthalein). Frisch geschnittenes Natrium.

3. Umlagerungsversuche

a) In 2n wässrigem Ammoniak, 2n Triäthylamin/Methanol, 2n Triäthylamin/tert. Butanol und 2n Triäthylamin/Chloroform

Man löst je 100 mg Hydrochlorid von O-Glycyl-β-hydroxybuttersäureamid und O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinamid in 10 ml Lösungsmittel und läßt 1, 6 und 72 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Das Reaktionsgemisch enthält nur unverändertes Ausgangsmaterial und wechselnde Mengen von Spaltprodukten (Papierchromatographie)⁺⁾ . Das Resultat dieser Versuche ist in der folgenden Tabelle X zusammengestellt:

Tabelle X

Reaktion in	Versuchsdauer in Stunden		
	1	6	72
Wasser	-	-	-
2n wässriger Ammoniak	++)		
2n Triäthylamin/Methanol	-	-	+) Gelbfärbung
2n Triäthylamin/tert. Butanol	-	-	-
2n Triäthylamin/Chloroform	-	-	-
+) teilweiser Zerfall, +++) vollständiger Zerfall, - unverändert			

b) In abs. tert. Butanol bzw. Dimethylformamid mit 1n Kalium-tert. butylat

1 m Mol feinpulverisiertes trockenes O-Aminoacyl-β-hydroxysäureamid-hydrochlorid wird bei 20° und Ausschluß von Feuchtigkeit in 30 ml abs. tert. Butanol bzw. Dimethylformamid suspendiert (Vibromischer) und mit 3 ml einer in 1n Lösung von

⁺⁾ Tabelle VI, Seite 43.

Kalium-tert. butylat in tert. Butanol⁺⁾ versetzt. Die in wenigen Augenblicken klare Lösung wird nach 15 bis 45 Minuten mit mindestens 3 Äquivalenten⁺⁺⁾ (ca. 1 gr.) feuchtem Ionenaustauscher Amberlite IR-120 (H-Form), mindestens 1 Äquivalent⁺⁺⁾ (ca. 0,4 gr.) feuchtem Ionenaustauscher Amberlite IRA-400 (OH-Form) und 30 ml destilliertem Wasser versetzt. Sobald das pH der Lösung auf 6 bis 7 gesunken ist, Chlor und Kalium⁺⁺⁺⁾ sich nicht mehr nachweisen lassen, filtriert man, und die ninhydrin-negative Lösung wird am Vakuum bei ca. 35° zur Trockene verdampft. Der kristalline Rückstand (Rohausbeute 80 bis 90 %), bestehend aus Umlagerungsprodukt und meist sehr wenig durch Hydrolyse entstandenem β -Hydroxysäureamid (Papierchromatographie)⁺⁺⁾ wird durch Kristallisation aus Methanol/Äther gereinigt. Rein-
ausbeute: 60 bis 80 %.

⁺⁾ Um ein Verstopfen der Meßpipette durch Kristallisation des Butanols zu verhindern, empfiehlt es sich, sie vorzuwärmen.

⁺⁺⁾ 1 g feuchtes Harz (abgesaugt) entspricht ca. 2,5 Milliäquivalenten Kalium bzw. Chlor.

⁺⁺⁺⁾ vgl. Seite 54.

⁺⁺⁾ vgl. Tabelle VI, Seite 43.

c) In flüssigem Ammoniak in Gegenwart von Natriumamid

Man kondensiert in einem 250 ml Vierhalskolben, versehen mit Gaseinleitungsrohr, Gasableitung und Vibrator, unter Kühlung mit Toluol/Trockeneis und Ausschluß von Feuchtigkeit trockenes Ammoniakgas⁺⁾ und trägt in ca. 50 ml des Kondensats 60 mg blankgeschnittenes Natrium (2,5 mg-Atom) ein. Nach spontaner Entfärbung der blauen Lösung wird unter gutem Durchmischen 1 mMol feinpulverisiertes trockenes O-Aminoacyl- β -hydroxysäureamid-hydrochlorid eingetragen, nach 5 Minuten das Kältebad entfernt und der Ammoniak bei Zimmertemperatur verdampft (ca. 30 Min.). Durch Eintauchen des Reaktionsgefäßes in eine Wasserbad von ca. 40° und Anlegen von Vakuum werden die letzten Reste von Ammoniak entfernt. Man versetzt mit 40 ml destilliertem Wasser und verfährt im übrigen analog Verfahren b).

Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle XI zusammengestellt.

⁺⁾ vgl. Seite 40.

Tabelle XI

Resultate von Aminoacyleinlagerungsversuchen mit Derivaten aliphatischer β -Hydroxysäureamide

Verbindung	Lösungs- mittel/ Äq. Base	Zeit Min.	Ausb. %	b) krist. aus	Smp. Habitus	c) Chr.	c) IR	Ber. :			
								Gef. :	C	H	O N
DL- β -Hydroxybutyryl- glycinamid (XIX)	t. Butanol 3 Äq. KTB	30	70	Äthanol/ Äther do.	107-108° Drusen do.	+	+	44,99	7,55	29,97	- f)
	t. Butanol 3 Äq. KTB	45	75			+		44,77	7,62	30,29	-
N-Benzoyl-DL-serin- glycinamid (XXI)	t. Butanol 3 Äq. KTB	30	80	Aceton/ Essigester do.	141,5-42° Prismen do.	+	+	54,33	5,70	-	15,84 f)
	Ammoniak 2,5 Äq. NaA	30	70			+		54,66	5,89	-	15,62
N-Benzoyl-L-seryl- glycinamid (XXX)	t. Butanol 3 Äq. KTB	30	65	Methanol/ Äther	156-157° Nadeln	+	+	54,33	5,70	-	15,84
								54,59	5,96	-	15,53
N-Benzoyl-glycyl- DL-seryl-glycinamid (XXXII)	t. Butanol 3 Äq. KTB	30	60	Methanol/ Äther	119-120° Nadeln			52,17	5,63	24,82	17,38 e)
	DMFA 3 Äq. KTB	40	60	do.	do.			51,97	5,89	25,09	17,10
N-Benzoyl-L-seryl- L-phenylalanyl- glycinamid (XXXIV)	DMFA	30		ca. 30 % unreines Produkt, vorläufig erst papierchromatographisch identifiziert							
	3 Äq. KTB Ammoniak 2,5 Äq. NaA	30									

a) 3 Äq. Base = Äquivalente Base, bezogen auf das Ausgangsmaterial in Form des Hydrochlorides.
KTB = Kalium-tert.butylat, NaA = Natriumamid, DMFA = Dimethylformamid.

b) Ausb. = Reinausbeute

c) Identifiziert mit Vergleichspräparat, papierchromatographisch und durch IR-Spektrum (Nujol, KBr).

d) $[\alpha]_D^{20} = +29,4^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,5, Äthanol, 95 %).

e) Ammoniak-Bestimmung: Ber. 5,28%, Gef. 5,4 %.- Partialhydrolyse (vgl. Seite 44): Benzoyl-glycin (s. Tabelle VI), Seryl-glycin (R_f -ascend. = 0,29 in Collidin, ges. m. Wasser).

f) über P_2O_5 getrocknet

IV) SYNTHESE DER VERGLEICHSPRÄPARATE

A) VERGLEICHSPRÄPARATE

In Tabelle XII findet sich eine Zusammenstellung der Vergleichspräparate. Alle wurden durch Amonalyse der un-
ter IV/B beschriebenen N-Benzoyl-di- und tripeptid-methylester erhalten.

Tabelle XII

Nr.	Verbindung	Krist. aus	Ausb. %	Smp.	Habitus	$[\alpha]_D$	Ber.: Gef.: C H O N %			
1.	DL-Hydroxybutyryl- glycinamid (XIX)	Äthanol/ Äther	58	108-109°	Nadel- büschel	-	44,99 44,86	7,55 7,49	29,97 30,05	- a) -
2.	N-Benzoyl-DL-seryl- glycinamid (XXI)	Methanol/ Äther	90	145-145,5°	kurze Prismen	-	54,33 54,64	5,70 5,95	- -	15,84a) 15,60
3.	N-Benzoyl-L-seryl- glycinamid (XXX)	Methanol/ Äther	85	156-156,5°	kleine Nadeln	+29,4° (0,5, EtOH 95%, 23°C)	54,33 54,14	5,70 6,00	- -	15,84 15,62
4.	N-Benzoyl-L-seryl- L-phenylalanyl- glycinamid (XXXIV)	Dimethyl- formamid/ Äther	50	261-265°	feinste Nadeln	-20,7° c = 0,78 DMFA, 25° b)	61,15 61,28	5,87 5,92	19,14 19,58	13,59 13,78

a) Über P_2O_5 getrocknet.

b) DMFA = Dimethylformamid.

B) ZWISCHENPRODUKTE BEI DER HERSTELLUNG DER VERGLEICHS - PRÄPARATE

1.) DL- β -Hydroxybutyryl-glycinmethylester

a) DL- β -Hydroxybuttersäurehydrazid¹³⁸⁾

Durch Hydrazinolyse^{+) von DL- β -Hydroxybuttersäuremethylester, Vorschrift von Levene und Scheidegger¹³⁸⁾ etwas abgeändert; vgl. Tabelle XIII.}

b) DL- β -Hydroxybutyryl-glycinmethylester

Zu einer Lösung von 5,9 g (50 m Mol) β -Hydroxybuttersäurehydrazid (1) in 50 ml 1n Salzsäure gibt man unter Rühren bei 0° 4,3 g (62,5 m Mol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser. Man fügt zur resultierenden wässrigen Azidlösung 3,75 g (50 m Mol) Glycin in 5 ml Wasser und tropft bei 0° während 60 Minuten 50 ml 2n Natronlauge ein. Zur Aufarbeitung wird die alkalische Lösung kurz mit n-Butanol geschüttelt, die wässrige Phase mit konzentrierter Salzsäure auf Kongo angesäuert und die ausgefallene Säure mit n-Butanol extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter Kochsalzlösung, Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 3,2 g (40 %) β -Hydroxy-butryl-glycin in Form eines dickflüssigen, schwach gelblichen Öles. Die so erhaltene Säure wurde mit ätherischer Diazomethanolösung verestert^{+) und direkt weiterverarbeitet.}

2.) N-Benzoyl-DL-serylglycinmethylester

a) N-Benzoyl-DL-serinhydrazid

Durch Hydrazinolyse^{+) von N-Benzoyl-serinmethylester¹⁵⁾. Vgl. Tabelle XIII.}

b) N-Benzoyl-DL-seryl-glycinmethylester

Lösung A: In einem 50 ml Scheidetrichter werden 0,65 g (3 m Mol) N-Benzoyl-DL-serinhydrazid (2) in 3 ml Wasser und 3,3 ml Salzsäure gelöst, im Eisbad auf 0° abgekühlt und 0,3 g (4 m Mol) Natriumnitrit in 0,5 ml Wasser einge-

^{+) Vgl. Seite 41.}

tragen. Das sofort ausfallende ölige Azid wird mit eiskaltem Essigester extrahiert und in der Kälte mit Natriumsulfat getrocknet.

Lösung B: Man suspendiert bei 0° und Ausschluß von Feuchtigkeit 0,76 g (6 m Mol) feinpulverisiertes Glycinmethylesterhydrochlorid in 6 ml Methylenchlorid und setzt durch Zugabe von 0,8 ml (6 m Mol) Triäthylamin den Ester in Freiheit. Es fällt Triäthylamin-hydrochlorid aus; nach 15 Minuten wird Lösung A hinzugefügt, mit Triäthylamin schwach alkalisch (ca. pH 8) gemacht und das Ganze über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Aufarbeitung werden die leichtflüchtigen Anteile im Vakuum bei 30° Badtemperatur entfernt, der Rückstand zwischen Essigester und 2n Salzsäure verteilt, mit 2n Salzsäure, danach mit 10 %-iger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Essigesters im Vakuum verbleiben 0,21 g (25 %) farbloses Öl, das beim Schütteln mit wenig Essigester spontan kristallisiert. Vgl. Tabelle XIII, Seite 61.

3) N-Benzoyl-L-seryl-glycinmethylester

a) N-Benzoyl-L-serinhydrazid

Durch Hydrazinolyse⁺⁾ von N-Benzoyl-L-serinmethylester^{70) ++)}. Vgl. Tabelle XIII.

b) N-Benzoyl-L-seryl-glycinmethylester

Darstellung analog der entsprechenden DL-Verbindung (siehe unter IV/B/2b). Vgl. Tabelle XIII.

4) N-Benzoyl-L-seryl-L-phenylalanyl-glycinmethylester

Nach dem Azidverfahren (siehe unter IV/B/2b) aus N-Benzoyl-L-serinazid und L-Phenylalanyl-glycinmethylester-perchlorat^{1a)}. Der Ester wurde direkt weiterverarbeitet.

⁺⁾ Vgl. Seite 41.

⁺⁺⁾ Siehe Seite 50 unter 2b.

Tabelle XIII

Zwischenprodukte bei der Herstellung der Vergleichspräparate

Nr.	Verbindung	Krist. aus	Ausb. %	Smp.	Habitus	[α] _D	Ber.: Gef.:			
							C	H	N	% %
1a	DL-8-Hydroxybuttersäurehydrazid (a)	Äthanol/ Äther	90	119-120°	Nadeln	-	40,66 40,97	8,53 8,72	23,71 23,42	b)
2a	N-Benzoyl-DL-serinhydrazid	Methanol/ Äther	80	174-176°	Prismen	-	53,80 53,93	5,87 5,85	18,83 18,96	
2b	N-Benzoyl-DL-seryl-glycinmethylester	Methanol/ Äther	20	132-133°	Nadeln	-	55,71 56,00	5,75 5,58	10,00 9,96	b)
3a	N-Benzoyl-L-serinhydrazid	Äthanol/ Äther	83	203-204° c)	Prismen	+ 21,5° (c = 1,4 In HCl, 21°)	53,80 54,03	5,87 6,08	18,83 18,63	
3b	N-Benzoyl-L-seryl-glycinmethylester	Methanol/ Äther	23	158 - 159°	Nadeln	+ 15,6° (c = 0,5 EtOH 95 %, 24°)	55,71 55,95	5,75 5,86	10,00 9,89	

a) Lit. Smp. 119-120° 138), Vorschrift etwas abgeändert.

b) über P₂O₅ getrocknet.

c) sublimiert ab 198° in feinen Nadeln.

V) VERSCHIEDENES

1) O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serin

Dargestellt nach der Phosgen-Methode⁴⁶⁾ +) aus Cbzo-glycin⁴²⁾ und N-Cbzo-DL-serin³³⁾. Ausbeute: 90 %, farbloses Öl⁺⁺⁾, gibt bei der Hydrogenolyse in Gegenwart von 1 Mol Salzsäure³³⁾ 34) O-Glycyl-DL-serin-hydrochlorid⁺⁺⁾, Smp. 171 - 174°.

2) N-Cbzo-DL-serinamid

Erhalten durch Amonolyse von N-Cbzo-DL-serinmethyl-ester¹³⁹⁾. Ausbeute: 80 %, Smp. 112 - 112,5°, Blättchen (Essigester/Petroläther).

$C_{11}H_{14}O_4N_2$	Ber. :	C 55,45	H 5,92	N 11,76 %
(238,24)	Gef.:	C 55,26	H 6,13	N 11,86 %

3) O-(Cbzo-glycyl)-N-Cbzo-DL-serinamid

Dargestellt nach der Phosgen-Methode⁺⁺⁺⁾ aus Cbzo-glycin⁴²⁾ und N-Cbzo-DL-serinamid. Ausbeute: 42 %, Smp. 141 - 141,5°, Drusen (Aceton/Äther).

$C_{21}H_{23}O_7N_3$	Ber. :	C 58,73	H 5,40	N 9,79 %
(429,42)	Gef.:	C 58,52	H 5,57	N 9,65 %

+) siehe Seite 46, Aufarbeitung b)

++) Diese Verbindungen sind schon auf anderem Wege dargestellt worden (80).

+++ siehe Seite 46, Aufarbeitung a)

4) O, N-Di-(Cbzo-glycyl)-DL-serin

Dargestellt nach der Methode der gemischten Anhydride mit Isovaleriansäure^{34) +)}. Ausbeute: 60 %, Smp. 126 - 128°, kleine Prismen (Essigester/Petroläther).

$C_{23}H_{25}O_9N_3$	Ber. :	C 56,67	H 5,17	N 8,62 %
(487,45)	Gef.:	C 56,72	H 5,47	N 8,81 %

ZUSAMMENFASSUNG

Die "Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion", ein durch J. P. Zimmermann, J. Wehrmüller und P. Quitt an Salicylsäurederivaten erschlossenes Prinzip zur Synthese von Peptiden, konnte auf Derivate aliphatischer β -Hydroxycarbonsäuren übertragen werden:

Das als Modellsubstanz gewählte O-Glycyl- β -hydroxybuttersäureamid und eine Reihe von O-(α -Aminoacyl)-N-acyl-serinamid-Derivaten lagern in Gegenwart von starken Basen, wie Kalium-tert.butylat oder Natriumamid zu β -Hydroxyacyl-(α -aminosäure)-amiden um. Aus praktischen Gründen diente als Amino-Schutzgruppe bei Serinderivaten der Benzoyl- oder der Benzoglycyl-Rest. Da der Amid-Stickstoff am Carbonyl der β -Hydroxysäure substituiert sein kann, gestattet die Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion den Aufbau von Peptid-Ketten. Auf die interessante Möglichkeit einer auf diesem Prinzip beruhenden Biosynthese wird hingewiesen.

^{+) siehe Seite 44, Abschnitt A, Aufarbeitung Seite 46, Verfahren b)}

Literatur

- 1) J.P. Zimmermann Diss. Basel 1952, vgl. Helv. 40, 1933 (1957)
- 1a) J.P. Zimmermann unveröffentlicht
- 2) J. Wehrmüller Diss. Basel 1955, vgl. Helv. 40, 2374 (1957)
- 3) P. Quitt Diss. Basel 1956, vgl. Helv. 40, 1497 (1957)
- 4) M. Brenner, J.P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt, I. Photaki Ex-
perientia 11, 397 (1955)
- 5) M. Brenner, J.P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt, A. Hartmann, W.
Schneider, U. Beglinger Helv. 40, 1497 (1957)
- 6) M. Brenner, P. Quitt Chimia 11, 342 (1957)
- 7) M. Brenner, J.P. Zimmermann Helv. 40, 1933 (1957)
- 8) M. Brenner, J. Wehrmüller Helv. 40, 2374 (1957)
- 9) R.A. Boissonnas und Mitarb. Experientia 12, 446 (1956)
und W. Rittel und Mitarb. Helv. 40, 614 (1957)
- 10) A. W. Titherley, W.L. Hicks J.chem. Soc. 1905, 1207, 1909, 908, 1911,
866,
A. W. Titherley ibid. 1910, 200,
J. McConnan, A.W. Titherley ibid. 1906, 1318, A.W. Titherley, E.C. Hughes
ibid. 1910, 1368, 1911, 1493, 1912, 219
- 11) A. Hantzsch Ber. deutsch. chem. Ges. 32, 575, 3066 (1899),
ibid. 38, 998 (1905)
- 12) W. Schneider unveröffentlicht
- 13) Th. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H.U. Lang, H.H. Lau
Liebigs Ann. Chem. 583, 129 (1953)
Th. Wieland, H.U. Lang, D. Liebsch
Liebigs Ann. Chem. 597, 227 (1956)
- 14) Th. Curtius Ber. deutsch. chem. Ges. 35, 3226 (1902)
- 15) M. Bergmann und A. Mikeley Z. physiol. Chem. 140, 128 (1924)
- 16) E. Brand, J.T. Edsall Annu. Rev. Biochem. 16, 224 (1947)
- 17) U. Beglinger unveröffentlicht
- 18) M. Brenner Helv. Physiol. Acta 15, C 14 - C 16 (1957)
- 19) H. Borsook 3^e Congrès International Biochimie, Bruxelles
(1955), Rapp. p. 54 und E. Gale, Rapp. p. 71
- 20) R.L.M. Synge Bioch. J. 33, 1924 (1939)
- 21) B.F. Elliott J. chem. Soc. 1949, 589
- 22) E.M. Fry J. Org. chem. 14, 887 (1949)
- 23) D.F. Elliott Biochem. J. 50, 542 (1952) I
- 24) L. Josefsson, P. Edman Biochim. Biophys. Acta 25, 614 (1957)
- 25) J.C. Sheehan, M. Goodman, G.P. Hess J. Amer. chem. Soc. 78, 1367
(1956)
- 26) G. Toennies, W. Sakami J. Biol. Chem. 144, 203 (1942)
- 27) M. Frankel und M. Halmann J. chem. Soc. 1952, 2735
- 28) G. Riley, J.H. Turnbull, W. Wilson J. chem. Soc. 1957, 1373
- 29) P.A. Levene, A. Schormüller J. biol. Chem. 105, 547 (1934)
- 30) R. Oesterberg Nature (L) 179, 476 (1957)

- 31) G. Fölsh, O. Mellander Acta chem. Scan. 11, 1232 (1957)
- 32) H.G. Reitz, R.E. Ferrel, H.S. Olcott, H. Fraenkel-Conrad
J. Amer. Chem. Soc. 68, 1024 (1946)
- 33) J.A. Moore, J.R. Dice, E.D. Nikolaides, R.D. Westland, E.L. Wittle
J. Amer. Chem. Soc. 76, 2884 (1954)
- 34) E.D. Nikolaides, R. D. Westland, E.L. Wittle J. Amer. Chem. Soc. 76,
2887 (1954)
- 35) L. Velluz, G. Amiard, R. Heymès Bull. Soc. Chim. 1955, 1283
- 36) Ch. G. Skinner, T.J. McCord, Joanne M. Ravel, W. Shive J. Amer. Chem.
Soc. 78, 2412 (1956)
- 37) H. Zahn, W. Gerstner Chem. Ber. 88, 1731 (1955)
- 38) S.P.L. Sörensen, A.C. Andersen Z. physiol. Chem. 56, 297 (1908)
- 39) E. Fischer Lieb. Ann. Chem. 375, 199 (1910)
- 40) S.M. Birnbaum, L. Levintow, R.B. Kingsley, J.P. Greenstein J. biol.
Chem. 194, 455 (1952)
- 41) J. S. Fruton J. biol. Chem. 146, 463 (1942)
- 42) M. Bergmann, L. Zervas Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932)
- 43) E. Baer, J. Maurukas J. biol. Chem. 212, 25 (1955)
- 44) E.E. Jones, D. Lipkin J. Amer. chem. Soc. 78, 2408 (1956)
- 45) C. Chester Stock, H. Christine Reilly, S.M. Buckley, D.A. Clarke Nature
(L) 173, 71, 72 (1954)
- 46) M. Brenner, J.P. Zimmermann, P. Quitt, W. Schneider, A. Hartmann
Helv. 40, 604 (1957)
- 47) P. Desnuelle, A. Casal Biochem. Biophys. Acta 2, 64 (1948)
- 48) J.I. Harris, R.D. Cole, N.G. Pon Biochem. J. 62, 154 (1956)
- 49) P. Desnuelle, G. Bonjour Bioch. Biophys. Acta 7, 451 (1951)
- 50) J.C. Crawhall, D.F. Elliott Biochem. J. 61, 264 (1955)
- 51) L. Zervas, P.G. Katsoyannis J. Amer. chem. Soc. 77, 5351 (1955)
- 52) J.L. Bailey Biochem. J. 60, 173 (1955)
- 53) H. Zahn, E. Schnabel Lieb. Ann. Chem. 604, 62 (1957)
- 54) H. Hörmann, W. Grassmann, E. Wünsch, H. Preller Chem. Ber. 89,
933 (1956)
- 55) M. Bergmann, E. Brand, F. Dreyer Ber. deutsch. chem. Ges. 54, 936 (1921)
- 56) E. Brand, B.F. Erlanger J. Amer. chem. Soc. 73, 3508 (1951)
- 57) K. Freudenberg, H. Eichel, F. Leutert Ber. 65, 1183 (1932)
- 58) A. Bertho, J. Maier Lieb. Ann. Chem. 498, 50 (1932)
- 59) D.A. Johnson J. Amer. chem. Soc. 75, 3636 (1953)
- 60) R.L. Barnden, R.M. Evans, J.C. Hamlet, B.A. Hems, A.B.A. Jansen, M.E.
Trevett, G. B. Webb J. chem. Soc. 1953, 3733
- 61) R.A. Boissonas Helv. 34, 874 (1951)
- 62) Th. Wieland, H. Bernhardt Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951)
- 63) J.R. Vaughan jr. J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 (1951) C
J.R. Vaughan jr., R.L. Osato ibid. 73, 5553 (1951)
- 64) A. Einhorn, F. Hollandt Lieb. Ann. Chem. 301, 100, 112 (1898)
- 65) Dov Ben-Ishai J. Amer. chem. Soc. 78, 4962 (1956)
- 66) G. Hagemann, L. Pénasse, J. Teillon Biochem. Biophys. Acta 17, 240
(1955)

- 67) E.M. Fry J. Org. Chem. 15, 802 (1950)
- 68) M.M. Botvinik und Mitarb. Chem. Zentralblatt 1954, I 1696
M.M. Botvinik und Mitarb. Chem. Zentralblatt 1955, I 563
- 69) M.M. Botvinik und Mitarb. Chem. Zentralblatt 1952, 7645
S.M. Avayeva, M.M. Botvinik Zhur.obshchei Khim. 26, 2329 (1956)
- 70) E.M. Fry J. Org. Chem. 15, 438 (1950)
- 71) C. Harington, T. Mead Biochem. J. 29, 1603 (1935)
- 72) Dov Ben-Ishai, A. Berger J. Org. Chem. 17, 1564 (1952)
- 73) J. Kollonitsch, Valeria Gabor, A. Hajos Chem. Ber. 89, 2293 (1956)
- 74) K. Schlögl, H. Fabitschowitz Sitzungsberichte Wien 162, 937 (1956)
S.G. Waley, J. Watson, J.Chem. Soc. 1953, 475
- 75) K. Hofmann, M. Bergmann J.biol.Chem. 130, 81 (1939)
- 76) H. Lindley Nature (L) 178, 647 (1956)
- 77) G.W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufmann, J. Snoko J.biol.Chem. 172, 221 (1948)
- 78) G.F. Woods, D.N. Kramer J.Amer.chem.Soc. 69, 2246 (1947)
- 79) Kenji Okawa Bull.Soc.Chem.Jap. 30, 110 (1957) C
- 80) W. Grassmann und E. Wünsch Fortschritte Chemie Org. Naturstoffe Wien, 13, 483 (1956)
- 81) B. Iselin, R. Schwyzer Helv. 39, 57 (1956)
- 82) Dragutin Fles, Branco Balenovic J. Amer. chem. Soc. 78, 3072 (1956)
- 83) K. Balenovic, B. Gaspert Chem. Ind. 1957, 115
- 84) M. Bergmann, L. Zervas J. biol. Chem. 113, 341 (1936)
- 85) A. Stoll, Th. Petrzilka Helv. 35, 589 (1952)
- 86) J.I. Harris, J.S. Fruton J. biol. Chem. 191, 143 (1951)
- 87) R.F. Fischer, R.R. Wethstone J. Amer. chem. Soc. 76, 5076 (1954)
- 88) H. Adkins, R.M. Ross, D.Ch. Schroeder, C.L. Mahoney, W.W. Gilbert J. Amer. chem. Soc. 76, 147 (1954)
- 89) K. Hofmann, A. Jöhl J. Amer. chem. Soc. 77, 2914 (1955)
- 90) R.B. Merryfield, D.W. Woolley J. Amer. chem. Soc. 78, 4646 (1956)
- 91) H. Zahn, E. Schnabel Lieb. Ann. Chem. 605, 212 (1957)
- 92) H. Zahn, J.F. Diehl Z. Naturforschung 12b, 85 (1957)
- 93) D.W. Woolley J. Biol. Chem. 172, 71 (1948)
- 94) Anneliese und Günther Hillmann Z. Naturforschung 6b, 340 (1951)
- 95) M.B. North, G.T. Young Chem. Ind. 1955, 1597
G.T.Young, M.B. North, N.A. Smart, XVI. Congrès International de Chimie Pure et Appliquée, Résumés des Communications II, 238, Paris 1957
- 96) M. Brenner, K. Rüfenacht Helv. 34, 2102 (1951)
- 97) G.W. Kenner, R.S. Stedman J. Chem. Soc. 1952, 2069
- 98) L. Velluz, G. Amiard, R. Heymés Bull. Soc. Chim. 1954, 1012
- 99) L. Velluz, J. Anatol, G. Amiard Bull. Soc. Chim. 1954, 1449
- 100) L. Velluz, G. Amiard, R. Heymés Bull. Soc. Chim. 1955, 201
- 101) G. Amiard, R. Heymés, L. Velluz Bull. Soc. Chim. 1955, 191
- 102) L. Zervas, D.M. Theodoropoulos J.Amer.chem.Soc. 78, 1359 (1956)
- 103) A. Hillmann-Elies, G. Hillmann, H. Jatzkewitz Z. Naturforschung 8b, 445 (1953)

- 104) Th. Wieland, Bärbel Heinke Lieb. Ann. Chem. 599, 70 (1956)
- 105) D.W. Clayton, J.A. Farrington, G.W. Kenner J.Amer. chem.Soc. 1957,
1398
- 106) R. Schwyzer, B. Iselin, M. Feurer Helv. 38, 69 (1955)
- 107) H. G. Khorana Chem. and Ind. 1955, 1087
- 108) J.C. Sheehan, G.P. Hess J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955) C
- 109) E. Schmidt, F. Hitzler, E. Lahde Chem. Ber. 71, 1933 (1938)
- 110) G. Amiard, R. Heymés Bull. Soc. Chim. 1956, 1360
- 111) J.C. Sheehan, J.J. Hlavka J. Org. Chem. 21, 439 (1956)
- 112) E. Baer, J. Maurukas J. biol. Chem. 228, 181 (1957)
- 113) H. Leuchs Ber. 39, 857 (1906)
- 114) W.E. Hanby, S. G. Waley, J. Watson J.chem. Soc. 1950, 3009
- 115) A.C. Farthing J. chem. Soc. 1950, 3213 (I)
D. Coleman, A.C. Farthing ibid. 3218 (II), D. Coleman ibid. 3222 (III)
- 116) C.H. Bamford, A. Elliott, W.E. Hanby Synthetic Polypeptides, Academic
Press, N.Y. 1956
- 117) J.L. Bailey Nature (L) 164, 889 (1949)
- 118) J.L. Bailey J. chem. Soc. 1950, 3461
- 119) W. Langenbeck, P. Kresse J. prakt. Chem. (4) 274, 261 (1955)
- 120) Th. Curtius J. prakt. Chem. 70, 202 (1904)
- 121) Neuere Methoden der Präparativen Org. Chemie, Verlag Chemie 1949, Seite
397
- 122) N. Bjerrum, L. Zechmeister Ber. 56, 897 (1923)
- 123) L. Rutter Analyst 75, 37 (1950)
- 124) R.J. Williams, H. Kirby Science 107, 481 (1948)
- 125) H.C. Chakraborty, D.D. Burma J.Ind.Chem.Soc. 32, 533 (1955)
- 126) F. Reindel, W. Hoppe Chem.Ber. 87, 1103 (1954)
- 127) H. Zahn, B. Wollemann, O. Waschka Z.physiol.Chem. 294, 100 (1953)
- 128) P.S. Chen, E. Hadorn Rev. suisse Zool. 62, 108 (1955)
- 129) H.F. Linskens Papierchromatographie in der Botanik
1955, Seite 25 modif.
- 130) F. Sanger, E.O.P. Thompson Biochem. Biophys. Acta 9, 225 (1952)
- 131) N.K. Schaffer, S. Harshman, R.R. Engle J.biol.Chem. 214, 799 (1955)
N.K. Schaffer, L. Simet, Sidn. Harshman, R.R. Engle J.biol.Chem. 225,
197 (1957)
- 132) H.C. Brown J. Amer. chem. Soc. 60, 1325 (1938)
- 133) H. Johansson Chem. Zentralblatt 1916, II, 557
- 134) M. Bergmann und Mitarb. Z. Physiol. Chem. 224, 33 (1934)
- 135) Th. Curtius J. prakt. Chem. 52, 252 (1895)
- 136) Organic Synthesis 26, 78 (1946)
- 137) Organic Synthesis 30, 18 (1950)
- 138) P.A. Levene, J. Scheidegger J. biol. Chem. 60, 179 (1924)
- 139) K. Schlögl, J. Derkosch, E. Wawersich
Monatshefte der Chemie 85, 607 (1954)
- 140) M. Brenner, H.R. Müller, R.W. Pfister
Helv. 33, 580 (1950)

Curriculum vitae

Am 30. Januar 1927 wurde ich, Albert Hartmann, in Grenzach/Baden (Deutschland) geboren. Nach 5 Jahren Volksschulbesuch wurde ich 1938 Schüler an der Oberrealschule in Lörrach und legte dort - nach Unterbrechung durch Wehrdienst und Gefangenschaft - im Juli 1947 die Reifeprüfung ab.

Im Herbst 1947 immatrikulierte ich mich an der Universität Freiburg i.Br. und begann nach zwei propädeutischen Semestern mit dem Chemiestudium. Zum Wintersemester 1949 wechselte ich an die Universität Basel und belegte dort Chemie als Hauptfach, Mineralogie, Physikalische Chemie und Botanik als Nebenfächer. Das Nebenfachexamen in Mineralogie bestand ich im Februar 1952, das in Physikalischer Chemie im Juni 1954 und das in Botanik im Juli 1957. Nach Absolvieren der Vorexamina in Anorganischer Chemie, Organischer Chemie und Farbenchemie begann ich im Juli 1954 unter der Leitung von Prof. Dr. M. Brenner die vorliegende Doktorarbeit.

Während des Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

In Freiburg i. Br.: G. Brauer, W. Eucken†, W. Gentner, G. Hesse, R. Mecke, H. Schneiderhöhn, H. Staudinger und W. Szilasi.

In Basel: P. Bearth, M. Brenner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, N. Geiger-Huber, C.A. Grob, F. Grün, P. Huber, H. Kuhn, W. Kuhn, E. Miescher, A. Portmann, T. Reichstein, M. Reinhardt, E. Schlittler, O. Schüepp, E. Sorkin, Ch. Tamm, R. Wizinger und H. Zollinger

